



Mistura de pão-de-abelha com mel – Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica

Adriana da Cruz Neves Fortes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por:

Prof. Dr. Vitor Manuel Ramalheira Martins
Prof. Dra. Paula Cristina Azevedo Rodrigues

Bragança
2023

Agradecimentos

Ter chegado até aqui e terminar esta dissertação enche-me de orgulho e satisfação, por ter posto a prova os meus limites e conhecimentos. É com grande gratidão e orgulho que finalizo mais um capítulo da minha jornada, por isso gostaria de agradecer a mim mesma pela força, garra, paciência e dedicação ao longo desse tempo. Sendo assim, não poderia deixar de expressar o meu agradecimento a todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram e estiveram comigo durante esse período para que este objetivo fosse alcançado.

Primeiramente, gostaria de muito de agradecer de coração a minha mãe, pelo suporte, atenção, amor incondicional, paciência e a motivação que sempre me deu para continuar a seguir em frente e enfrentar obstáculos de cabeça erguida. Por todas as reclamações que ela teve de ouvir por causa do meu cansaço mental e emocional, mas sempre me apoiando de forma incondicional. Sem o apoio dela não teria conseguido e nem chegado até aqui. Muito obrigada, mãe!!!

Quero agradecer e expressar minha eterna gratidão ao meu orientador, o Professor Doutor Vitor Manuel Ramalheira Martins, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pela proposta do tema que me foi apresentada. Pela sua orientação que foi incansável, pela dedicação, disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos, paciência, pelas críticas, correções e sugestões durante todo o processo de trabalho.

À minha coorientadora, Professora Doutora Paula Cristina Azevedo Rodrigues, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pela sua disponibilidade, dedicação, paciência, correções e conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Doutor Miguel Vilas Boas, quero agradecer pela atenção dedicada, pela disponibilidade, pela ajuda constante oferecida e por todo o conhecimento que me transmitiu, paciência, amizade e carinho.

À Andreia Tomás, quero expressar minha gratidão pelo constante estímulo durante o trabalho. Além disso, sou grata por toda a assistência oferecida no laboratório e no

trabalho, por todas as sugestões compartilhadas, pelos conselhos, pela companhia, pela paciência, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

À Filipe Lemas, gostaria de expressar minha gratidão pela sua atenção, carinho, prontidão, dedicação, pela assistência constante, por todo o conhecimento compartilhado e pela amizade demonstrado desde o começo do trabalho.

As pessoas que me ajudaram nos laboratórios, à Soraia Falcão, dona Céu, Kheira Mouffok, Seymanur Ertosun, Volkan Aylanc e Bruna, obrigada pela ajuda e disponibilidade.

Um obrigado ao meu pai, aos meus avós, a minha madrinha e a todos os meus familiares por me encorajarem sempre, pelo constante apoio e motivação, pela paciência, carinho, amor incondicional e por torcerem sempre por mim e pelas minhas conquistas.

Um grande obrigado de coração à Solangela Semedo, por estar sempre comigo, por me aturar, ouvir os meus problemas, medos, reclamações constantes, as crises de ansiedade, as nossas conversas, pelo apoio incondicional, pela motivação, paciência, amizade, carinho, amor, conselhos dados e por torcer sempre por mim.

E por fim aos meus amigos que não foram citados, mas que estiveram presentes durante esse processo e torceram por mim, pelo apoio, amor paciência, conversas, conselhos e carinho.

Um grande obrigado a todos vocês pelo apoio!!!

Resumo

O pão de abelha é um produto apícola originado nos favos de mel, através da fermentação láctica do pólen apícola recolhido e parcialmente processado pelas abelhas. Este produto apícola tem uma composição química que o torna interessante, não só do ponto de vista nutricional, mas também em termos das suas propriedades biológicas. No entanto, este interesse não tem sido acompanhado pelos apicultores, devido ao acesso limitado a informação científica e, por outro lado, devido à dificuldade associada ao processo de extração deste produto.

O presente trabalho tem como objetivo geral valorizar o pão de abelha através da sua utilização na obtenção de um produto diferenciado, neste caso uma mistura de pão de abelha com mel. O objetivo específico foi avaliar a estabilidade físico-química e microbiológica deste produto ao longo de seis meses de conservação a temperatura ambiente. A mistura (30% pão de abelha: 70% mel) foi analisada no momento de preparação (T0) e após um (T1), três (T3) e seis (T6) meses. Para cada tempo de armazenamento, foram avaliados vários parâmetros físico-químicos (pH, atividade da água, teor de humidade, teor de proteínas, teor de gordura, teor de hidratos de carbonos e de açúcares, teor de cinzas, acidez livre, cor, compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante) e microbiológicos (mesófilos aeróbios, bactérias do ácido láctico, leveduras e bolores, coliformes e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e esporos de clostrídios sulfito redutores).

A mistura obtida apresentou teores de humidade, hidratos de carbono, proteínas, gordura e cinzas de 12-14%, 77,52-83,03%, 6,01-6,40%, 1,89-2,78% e 0,72-0,77%, respetivamente. Esta composição evidencia uma matriz alimentar nutricionalmente rica em hidratos de carbono, devido à presença de mel na sua composição (frutose e a glucose). Foram ainda registados valores de pH e acidez livre compreendidos entre 3,4-3,7 e 100,3-132,0 meqKg⁻¹, respetivamente, o que aliado a valores de atividade da água situados entre 0,53-0,57, poderão conferir uma melhor conservação da mistura obtida, retardando o crescimento de microrganismos. Para além disto, as misturas obtidas apresentaram teores de compostos fenólicos totais de 4,35-8,3 mg/g, de flavonóides 1,0-1,14 mg/g e apresentaram uma atividade antioxidante, avaliada através do efeito bloqueador de radicais livres DPPH, compreendida entre 39,24 e 55,13%.

Em termos dos resultados microbianos, os mesófilos aeróbios variaram entre 2,33 e 3,12 \log_{10} UFC/g, os bolores variaram entre 2,52 e 2,56 \log_{10} UFC/g, as leveduras variaram entre não detetado e 2,61 \log_{10} UFC/g, os esporos de clostrídios sulfito-redutores diminuíram ao longo do tempo, de 0,82 \log_{10} UFC/g para indetetável, enquanto que as bactérias do ácido láctico, os coliformes, a *e.coli* e *s.aureus* não foram detetados. Os resultados foram detetados em níveis baixos, não apresentando diferenças significativas ao longo do tempo de armazenamento, mantendo-se assim a estabilidade microbiana, porque durante tempo de armazenamento, os microrganismos mantiveram-se estáveis ao longo do tempo.

Relativamente à avaliação da estabilidade físico-química da mistura, verificou-se que, de uma forma geral, não existiram variações estatisticamente significativas, nomeadamente no que diz respeito a acidez livre, teor de humidade, teor de cinzas, gorduras, proteínas, hidratos de carbono, açúcares e flavonoides. No caso da atividade da água, pH, cor, compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante, verificaram-se variações estatisticamente significativas, em que alguns possuem um reduzido impacto, como é o caso dos compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante e a cor. Os teores de compostos fenólicos totais aumentaram ao longo do armazenamento (4,67 mg GAE/g para a mistura recém-preparada e 8,30 mg GAE/g, ao final de 6 meses de armazenamento), e a atividade antioxidante, que apresentou uma redução desde uma percentagem de inibição de 46,9%, para a mistura recém-preparada, até um valor de 39,2%.

Os resultados obtidos evidenciam uma estabilidade microbiológica, físico-química e nutricional da mistura de pão de abelha e mel, durante o período de armazenamento avaliado. Neste sentido, este produto parece ser uma boa opção de utilização e valorização do pão de abelha pelos produtores, permitindo assim aumentar o rendimento obtido na prática apícola.

Palavras-chave: apicultura, produto inovador, estabilidade, conservação

Abstract

Bee bread is a bee product produced in honeycombs through the lactic fermentation of bee pollen collected and partially processed by the bees. This bee product has a chemical composition that makes it interesting, not only from a nutritional point of view, but also in terms of its biological properties. However, this interest has not been followed up by beekeepers, due to limited access to scientific information and, on the other hand, due to the difficulty associated with the process of extracting this product.

The general aim of this work is to enhance the value of bee bread by using it to produce a differentiated product, in this case a mixture of bee bread and honey. The specific objective was to evaluate the physicochemical and microbiological stability of this product over six months of storage at room temperature. The mixture (30% bee bread: 70% honey) was analyzed at the time of preparation (T0) and after one (T1), three (T3) and six (T6) months. For each storage time, various physicochemical parameters were assessed (pH, water activity, moisture content, protein content, fat content, carbohydrate and sugar content, ash content, free acidity, color, total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity) and microbiological parameters (aerobic mesophiles, lactic acid bacteria, yeasts and molds, coliforms and *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and sulfite-reducing clostridia spores).

The mixture obtained had moisture, carbohydrate, protein, fat and ash contents of 12-14%, 77.52-83.03%, 6.01-6.40%, 1.89-2.78% and 0.72-0.77%, respectively. This composition shows a food matrix that is nutritionally rich in carbohydrates, due to the presence of honey in its composition (fructose and glucose). There were also pH and free acidity values of between 3.4-3.7 and 100.3-132.0 mgKg⁻¹, respectively, which, together with water activity values of between 0.53-0.57, could make the mixture better preserved by slowing down the growth of microorganisms. In addition, the mixtures obtained had total phenolic compound contents of 4.35-8.3 mg/g, flavonoids of 1.0-1.14 mg/g and antioxidant activity, assessed through the DPPH free radical blocking effect, of between 39.24 and 55.13%.

In terms of microbial results, aerobic mesophiles ranged from 2.33 to 3.12 log₁₀ CFU/g, molds ranged from 2.52 to 2.56 log₁₀ CFU/g, yeasts ranged from not detected to 2.61 log₁₀ CFU/g, sulfite-reducing clostridia spores decreased over time, from 0.82 log₁₀

CFU/g to undetectable, while lactic acid bacteria, coliforms, e. coli and s.aureus were not detected. The results were detected at low levels, with no significant differences over the storage time, thus maintaining microbial stability, because during the storage time, the microorganisms remained stable over time.

When it came to assessing the physicochemical stability of the mixture, it was found that, in general, there were no statistically significant variations, particularly with regard to free acidity, moisture content, ash content, fats, proteins, carbohydrates, sugars and flavonoids. In the case of water activity, pH, color, total phenolic compounds and antioxidant activity, there were statistically significant variations, some of which had little impact, such as total phenolic compounds, antioxidant activity and color. The content of total phenolic compounds increased over the course of storage (4.67 mg GAE/g for the freshly prepared mixture and 8.30 mg GAE/g at the end of 6 months of storage), as did the antioxidant activity, which showed a reduction from an inhibition percentage of 46.9% for the freshly prepared mixture to a value of 39.2%.

The results obtained show the microbiological, physico-chemical and nutritional stability of the mixture of bee bread and honey during the storage period evaluated. In this sense, this product seems to be a good option for producers to use and value bee bread, thus allowing them to increase their beekeeping income.

Keywords: beekeeping, innovative product, stability, conservation

Índice geral

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xiv
Capítulo 1	15
1. Introdução.....	16
1.1. Enquadramento	16
1.2. Objetivos	17
Capítulo 2	18
2. Revisão da literatura.....	19
2.1. Mel.....	19
2.1.1. Caracterização físico-química	20
2.1.2. Caracterização microbiológica	22
2.1.3. Modo de conservação	23
2.2. Pão de Abelha	24
2.2.1. Caracterização físico-química	25
2.2.2. Caracterização microbiológica	28
2.2.3. Modo de obtenção e conservação.....	30
2.2.3.1. Modo de obtenção.....	30
2.2.3.2. Métodos de conservação	31
2.2.4. Benefícios e valorização.....	33
Capítulo 3	35
3. Materiais e métodos	36

3.1. Preparação das matérias-primas.....	36
3.2. Preparação da mistura	36
3.3. Plano de amostragem.....	38
3.3.1. Matérias-primas	38
3.3.2. Mistura.....	39
3.4. Métodos analíticos	40
3.4.1. Parâmetros físico-químicos	40
3.4.1.1. Análise polínica	40
3.4.1.2. Determinação da cor.....	41
3.4.1.3. Determinação do pH e acidez livre.....	41
3.4.1.4. Teor de humidade.....	42
3.4.1.5. Atividade da água	43
3.4.1.6. Teor de proteína.....	43
3.4.1.7. Teor de gordura	44
3.4.1.8. Teor de cinzas	44
3.4.1.9. Hidratos de carbono	45
3.4.1.10. Açúcares	46
3.4.1.10.1. Preparação das amostras.....	46
3.4.1.10.2. Condições Cromatográficas	46
3.4.1.11. Análise de compostos fenólicos	47
3.4.1.11.1. Extração dos compostos fenólicos	47
3.4.1.11.2. Teor de compostos fenólicos totais	48
3.4.1.11.3. Teor total de flavonóides.....	48
3.4.1.11.4. Atividade antioxidante (efeito bloqueador de radicais livres DPPH).....	48

3.4.2. Parâmetros microbiológicos	49
3.4.2.1. Aeróbios mesófilos	49
3.4.2.2. Bolores e leveduras	50
3.4.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	50
3.4.2.4. Esporos de clostrídios sulfito-redutores.....	50
3.4.2.5. Bactérias do ácido lático	51
3.4.2.6. Coliformes e <i>E.coli</i>	51
Capítulo 4	52
4. Resultados e Discussão.....	53
4.1. Caracterização das matérias-primas e da mistura.....	53
4.1.1. Análise polínica do mel e do pão de abelha.....	53
4.1.2. Caracterização físico-química.....	54
4.1.2.1. Cor.....	54
4.1.2.2. pH e acidez livre.....	56
4.1.2.3. Teor de humidade e atividade da água (a_w)	58
4.1.2.4. Teores de proteínas, gorduras e cinzas	60
4.1.2.5. Teor de hidratos de carbono e açúcares.....	62
4.1.2.6. Teor de compostos fenólicos, teor de flavonóides e avaliação da atividade antioxidante.....	64
4.1.3. Caracterização microbiológica	67
4.1.3.1. Mesófilos aeróbios.....	67
4.1.3.2. Bolores e leveduras	68
4.1.3.3. Coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	70
4.1.3.4. Esporos de clostrídios sulfito-redutores.....	71
4.1.3.5. Bactérias do ácido lático	72

Capítulo 5	73
4.2. Avaliação da estabilidade da mistura durante o armazenamento	74
4.3. Estabilidade físico-química.....	74
4.3.1. Cor.....	74
4.3.2. pH e acidez livre	75
4.3.3. Teor de humidade e atividade da água (aw).....	76
4.3.5. Teor de hidratos de carbono e açúcares	79
4.3.6. Compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante ...	80
4.4. Estabilidade microbiológica	83
Capítulo 6	85
5. Conclusões.....	86
Referências Bibliográficas.....	88
Anexo	95

Índice de figuras

Figura 1- Favo de mel e pão de abelha	24
Figura 2- Máquina usada para extração do pão de abelha do favo.....	36
Figura 3- Preparação da mistura de pão de abelha e mel.....	37
Figura 4- Homogeneização da mistura.....	39
Figura 5- Determinação da cor	41
Figura 6- Titulador automático	42
Figura 7- Determinação do teor de humidade	42
Figura 8- Medidor de a_w	43
Figura 9- Método de Kjeldahl	44
Figura 10- Determinação do teor de gordura bruta, através da Extração em Soxhlet.....	44
Figura 11- Determinação do teor de cinzas.....	45
Figura 12- Extração dos compostos fenólicos.....	47
Figura 13- Escala de cores do mel.....	55
Figura 14- Avaliação da cor do pão de abelha.....	56
Figura 15- Avaliação do pH e acidez livre nas matérias-primas e na mistura T0.....	58
Figura 16- Teor de humidade e a_w das matérias-primas e na mistura T0.....	60
Figura 17- Teor de proteínas, gorduras e cinzas nas matérias-primas e na mistura T0.....	62
Figura 18- Avaliação dos hidratos de carbono e dos açúcares livre nas matérias-primas e na mistura T0.....	64
Figura 19- Teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante nas matérias-primas e na mistura T0.....	66
Figura 20- Avaliação dos mesófilos aeróbios nas matérias-primas e na mistura T0.....	68
Figura 21- Avaliação dos bolores e leveduras nas matérias-primas e na mistura T0....	70
Figura 22- Avaliação <i>staphylococcus aureus</i> nas matérias-primas e na mistura T0.....	71
Figura 23- Avaliação dos esporos de clostrídios sulfito- reductores nas matérias-primas e na mistura T0.....	71

Figura 24- Avaliação das bactérias do ácido lático nas matérias-primas e na mistura T0.....	72
Figura 25- Avaliação da cor da mistura ao longo do tempo.....	75
Figura 26- Avaliação do pH e acidez livre na mistura ao longo do tempo.....	76
Figura 27- Teor de humidade e a_w na mistura ao longo do tempo.....	77
Figura 28- Teor de cinzas, proteínas e gorduras na mistura ao longo do tempo.....	78
Figura 29- Avaliação dos hidratos de carbono e da frutose e glucose na mistura ao longo do tempo.....	80
Figura 30- Teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante na mistura ao longo do tempo.....	82
Figura 31- Avaliação microbiológica na mistura ao longo do tempo.....	84

Índice de tabelas

Tabela 1- Limites estabelecidos para o mel.....	21
Tabela 2- Composição nutricional do pão de abelha.....	25
Tabela 3- Composição química do pão de abelha de alguns países.....	27
Tabela 4- Comparação da a_w do pão de abelha de diferentes espécies.....	29
Tabela 5- Análise polínica do mel e do pão de abelha.....	53
Tabela 6- Cores padrão do mel.....	54



Capítulo 1

- 1. Introdução
 - 1.1. Enquadramento
 - 1.2. Objetivos

1. Introdução

1.1. Enquadramento

A apicultura é uma prática agrícola, direcionada para o controlo e criação de abelhas, com a finalidade de obtenção de produtos apícolas, como o mel, a cera, o pólen, a própolis, a geleia real e o veneno de abelha (apitoxina). Para além destes produtos, é possível obter da colmeia o chamado pão de abelha, que resulta da fermentação láctica, ocorrida ainda na colmeia, de uma mistura de pólen, mel e enzimas digestivas das abelhas (Tomás, 2013). No entanto, o pão de abelha é de difícil extração, sendo, por vezes, necessário destruir os quadros para a sua obtenção. Este facto, aliado ao reduzido conhecimento das suas características, tem contribuído para o pouco interesse dos apicultores por este produto apícola, daí resultando valorização. No entanto, mais recentemente tem-se verificado o aumento na curiosidade, por parte da comunidade científica, em torno deste produto.

O mel, que é o produto apícola mais produzido, é um alimento naturalmente adocicado. É produzido pelas abelhas *Apis mellifera*, à base do néctar recolhido das flores e de excreções de insetos que são processados pelas enzimas digestivas das abelhas, sendo depois armazenado nos favos das suas colmeias para ser usado como o alimento delas (Tomás, 2013). O mel é um alimento natural, por isso a sua avaliação microbiológica e físico-química é de extrema importância, já que é muito usado por todos os consumidores, exceto as crianças menores de 1 ano de idade. Para um melhor controlo da qualidade do mel, deve-se monitorizar esses parâmetros durante o seu armazenamento, pois só assim será possível garantir a segurança alimentar deste produto (Lopes, 2013). O mel é um produto relativamente estável, possui elevada riqueza em açúcares e contém um teor de humidade reduzido. Para além disso, a sua atividade de água (a_w) situa-se normalmente abaixo de 0,60, o que faz com que o crescimento dos microrganismos responsáveis pela deterioração do mel, como as leveduras osmotolerantes, seja inibido.

O pão de abelha é um produto apícola muito rico em proteínas, aminoácidos essenciais, açúcares simples e ácidos gordos (Smati, 2022). É a principal fonte de proteínas para as larvas das abelhas e para o crescimento das abelhas jovens, e por isso faz parte da alimentação das abelhas (Mohammad *et al.*, 2020). Para além disso, o pão de abelha é visto com um alimento funcional, por possuir um alto valor nutritivo, para além de uma elevada diversidade de compostos bioativos, tais como compostos fenólicos

Tendo isto em consideração, o pão de abelha tem sido classificado como um suplemento alimentar precioso para o consumo humano, estando atualmente a ser cada vez mais usado na alimentação devido às suas propriedades benéficas para a saúde humana (Mohammad *et al.*, 2020).

1.2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral valorizar o pão de abelha, que atualmente é um produto apícola pouco valorizado. Pretende-se fazer a valorização do pão de abelha através da sua utilização na obtenção de um produto diferenciado, neste caso a mistura de pão de abelha com mel (30% pão de abelha: 70% mel). Sendo o mel um auxiliar na valorização e conservação desta mistura, pois o mel é um produto apícola nutricionalmente interessante, que contém uma estabilidade ótima devido as suas características nutricionais como, a a_w , humidade e pH baixos e também uma viscosidade, teores de açúcares e pressão osmótica elevadas, e pelo facto de ser um produto muito valorizado e conhecido pelos consumidores

O objetivo específico foi avaliar a estabilidade físico-química e microbiológica deste produto ao longo de seis meses de conservação a temperatura ambiente. A mistura foi analisada no momento de preparação (T0) e após um (T1), três (T3) e seis (T6) meses. Para cada tempo de armazenamento, foram avaliados vários parâmetros físico-químicos (pH, atividade da água, teor de humidade, teor de proteínas, teor de gordura, teor de hidratos de carbonos e de açúcares, teor de cinzas, acidez livre, cor, compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante) e microbiológicos (mesófilos aeróbios, bactérias do ácido láctico, leveduras e bolores, coliformes e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e esporos de clostrídios sulfito redutores).



Capítulo 2

2. Revisão literária

2.1. Mel

2.2. Pão de abelha

2. Revisão da literatura

2.1. Mel

O mel é um alimento natural com elevado valor energético, sendo consumido no mundo inteiro e utilizado para o tratamento de doenças desde há muito anos (Caveiro, 2017).

De acordo com o Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro, o mel é uma “substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia.”

Tendo em consideração o mesmo Decreto-Lei, podemos ter diferentes tipos de mel, de acordo com diferentes critérios:

- A origem:
 - mel de néctar ou mel de flores;
 - mel de melada.
- O modo de produção ou apresentação:
 - mel em favos;
 - mel com pedaços de favos.

O mel é classificado como monofloral quando seu conteúdo de pólen é derivado principalmente de flores de uma única família, gênero ou espécie e possui propriedades organolépticas e físico-químicas únicas. Se o pólen representar mais de 45%, é considerado monofloral de uma determinada espécie (Lopes, 2014).

No entanto, existem algumas exceções a esta regra geral, uma vez que existem plantas que estão sobre-representadas e sub-representadas no espectro do pólen. A percentagem a considerar é inferior a 45% para plantas sub-representadas e superior a 45% para plantas mais representativas, sendo que o valor a considerar dependerá da avaliação inicial da capacidade de produção de pólen da planta (Lopes, 2014).

Os aspetos organoléticos do mel, como o sabor e a cor estão profundamente relacionados com a origem floral, que é aplicada na tipificação do mesmo como medida de valorização do produto. Existe uma vasta multiplicidade de méis monoflorais, onde os mais comuns são o mel de rosmaninho (*Lavandula stoechas*), o mel de urze (*Erica umbellata*) e o mel de castanheiro (*Castanea sativa*) (Lopes, 2013).

O mel é um produto muito apreciado e procurado pelo consumidor, já que tem sido usado como alimento desde os primeiros tempos, representando uma fonte alimentar sustentável e natural, para além de oferecer muitos outros benefícios e vantagens para a saúde humana (Lopes, 2013). Como resultado das suas propriedades benéficas, o mel tem sido utilizado em várias culturas, por exemplo como remédio para as queimaduras, cataratas e cicatrização de feridas, uma vez que apresenta um efeito calmante ao ser aplicado em feridas abertas (Alvarez-Suarez et al., 2010). Também contém um número elevado de compostos que lhe conferem características bioativas, tais como, atividade antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, antiteratogénica, analgésica e antibacteriana (Caveiro, 2017).

2.1.1. Caracterização físico-química

O mel possui uma composição muito complexa tendo em torno de 200 substâncias (S. Lopes, 2013), sendo as mais abundantes os monossacarídeos, como a frutose e a glucose, contribuindo com cerca de 80 a 85% dos sólidos solúveis totais (Delsin, 2019). Em menor quantidade podem ser encontrados, os dissacarídeos, como a maltose e a sacarose, para além de alguns oligossacarídeos (Delsin, 2019). Outros componentes que estão também presentes no mel, embora em reduzidas quantidades, são os sais minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, aminoácidos, flavonóides, ácidos fenólicos, compostos responsáveis pelo aroma e outros fitoquímicos (Alvarez-Suarez et al., 2010).

Para além disso, o mel também contém algumas enzimas importantes, nomeadamente a diástase (α e β -amilase), a glicose oxidase e a invertase (α -glucosidase) (Iliá et al., 2021). Existem também outras enzimas como a catalase e a fosfatase ácida. Estas possuem a função de catalisadores biológicos, isto é, aceleram a grande parte das reações do mel e também são responsáveis pelas alterações que acontecem nas propriedades físico-químicas e nutricionais de alguns méis (Caveiro, 2017).

O mel apresenta na sua composição 18-22% de água, sendo possível encontrar minerais, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos, proteínas, polifenóis, compostos aromáticos e aminoácidos, mas em proporções pequenas (Iliá *et al.*, 2021).

Porém a sua composição depende não só da origem floral, já que é ela que atribui as características essenciais, mas também do clima, das condições ambientais, da manipulação e do processamento (Lopes, 2013).

A qualidade do mel é principalmente determinada pelas características sensoriais, físicas, químicas e microbiológicas. Os critérios de qualidade físico-química do mel encontram-se bem definidos na Directiva CE nº 2001/110 de 20 de Dezembro 2001, (**Tabela 1**), e também podem ser delimitados pela prática comercial (Directiva 2001/110/CE do Conselho, de 20 de Dezembro de 2001, relativa ao mel, 2001).

Tabela 1: Limites mínimos e máximos estabelecidos para o mel de néctar e mel de melada e misturas de mel de melada com mel de néctar (Directiva 2001/110/CE do Conselho, de 20 de Dezembro de 2001, relativa ao mel, 2001).

Parâmetros	Limites
Teor de Açúcares (Frutose e Glucose)	Mel de néctar $\geq 60\text{g}/100\text{g}$ Mel de melada e misturas de mel de melada com mel de néctar $\geq 45\text{ g}/100\text{ g}$
Teor de Sacarose	Em geral $5\text{ g}/100\text{ g}$: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Citrus spp.</i> $\leq 10\text{g}/100\text{g}$; • <i>Lavandula spp.</i> $\leq 15\text{ g}/100\text{ g}$
Teor de Água	Em geral $\leq 20\%$
Teor de Matérias Insolúveis na Água	Em geral $\leq 0,1\text{ g}/100\text{g}$
Condutividade Elétrica	Em geral $\leq 0,8\text{ mS}$
Teor de Ácidos Livres	Em geral $\leq 50\text{ meq}/\text{kg}$ <ul style="list-style-type: none"> • Mel para uso industrial $\leq 80\text{ meq}/\text{kg}$
Índice diastásico e teor de hidroximetilfurfural (HMF), determinados após tratamento e mistura:	
<ul style="list-style-type: none"> • Índice Diastásico (escala de Schade) 	Em geral ≥ 8 <ul style="list-style-type: none"> • Méis com baixo teor natural de enzimas e teor de HMF não superior a $15\text{ mg}/\text{kg} \geq 3$
<ul style="list-style-type: none"> • Hidroximetilfurfural (HMF) 	Em geral $\leq 40\text{mg}/\text{kg}$ <ul style="list-style-type: none"> • Mel de origem de clima tropical $\leq 80\text{mg}/\text{kg}$

2.1.2. Caracterização microbiológica

A caracterização da qualidade microbiológica de um alimento gera muitas informações que ajudam a analisá-lo em termos das condições de processamento e de conservação, as condições em que devem ser feitas as distribuições para o consumo e o tempo de prateleira (Lopes, 2013).

Normalmente o mel é visto como um produto seguro microbiologicamente (Alvarez-Suarez et al., 2010), uma vez que contém um teor de humidade e atividade da água (a_w) baixo, um pH baixo, uma viscosidade alta, um teor de açúcar elevado e a pressão osmótica alta. Devido a essas características faz com que não haja crescimento microbiano, pois elas inibem o crescimento dos microrganismos (Lopes, 2013).

No mel, as contaminações podem acontecer por meio de fontes primárias, como por exemplo através do pólen, do trato digestivo da abelha, da poeira, do ar, da sujidade e das flores, sendo muito difícil controlá-los. Para além destas fontes primárias de contaminação, podemos também identificar fontes secundárias, relacionadas com os manipuladores, as contaminações cruzadas e os equipamentos utilizados durante o processamento do mel (Lopes, 2013).

Ainda assim, apesar do baixo pH e elevadas concentrações de açúcares, o mel poderá possibilitar o crescimento de algumas leveduras, nomeadamente as leveduras osmófilas. Estas leveduras são tolerantes ao açúcar, o que constitui um problema em méis granulados. Contudo, o seu crescimento, e consequente processo de fermentação do mel, é limitado dada a pouca água à sua disposição (Lopes, 2013). As leveduras osmófilas que podemos encontrar no mel pertencem aos géneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torula* e *Zygosaccharomyces* (Čadež et al., 2015; Migdał et al., 2000; Rodríguez-Andrade et al., 2019).

Os fungos filamentosos (bolores) têm também alguma relevância na contaminação do mel, dada a persistência dos seus esporos em ambientes extremos. Os géneros predominantes são os xerófilos *Ascosphaera* e *Bettsia* (Kačániová et al., 2012), assim como os xerotolerantes *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* (Kačániová et al., 2012; Kiš et al., 2019; Rodríguez-Andrade et al., 2019; Sinacori et al., 2014)

Apesar de a microbiota do mel ser composta principalmente por bolores e leveduras, podem também ser encontrados esporos de algumas bactérias, como *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp., que afetam de uma forma negativa a segurança do mel e, consequentemente, a respetiva qualidade (Grabowski & Klein, 2017; Vargas, 2006). Os

esporos de bactérias mais correntes pertencem ao género *Bacillus* e nomeadamente *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, e *B. coagulans* (López & Alippi, 2009; Sinacori *et al.*, 2014). No mel, os esporos de clostrídeos sulfito-redutores indicam contaminação, mas quase sempre estão em baixas quantidades (Grabowski & Klein, 2017; Lopes, 2013; Maikanov *et al.*, 2019). Os esporos de espécies de *Clostridium* não têm capacidade de germinar e produzir toxinas no mel, devido às condições limitantes de atividade de água e pH (Dorner, 2022). No entanto, a sua persistência pode conduzir a doenças após a ingestão do mel.

A ingestão do mel é particularmente perigosa para bebés e crianças, devido à potencial presença de esporos de *C. botulinum*, que podem germinar no intestino e gerar a toxina botulínica *in situ* (Dorner, 2022). Em consequência disso, as autoridades aconselham que este produto não seja dado a crianças com idade inferior a 1 ano (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2005). Para além disso, mesmo que a ocorrência desses microrganismos seja baixa, também podem causar problemas em pessoas com o sistema imunitário comprometido e/ou quando é usado de forma terapêutica em feridas (Dorner, 2022).

2.1.3. Modo de conservação

É de extrema importância conhecer os componentes de um produto alimentar, bem como as suas variações ao longo do armazenamento, de forma a garantir a qualidade do mesmo num mercado cada vez mais exigente (Lopes, 2013). Para preservar a qualidade do mel, é essencial conservá-lo de forma adequada, por isso é importante controlar alguns parâmetros, particularmente a temperatura de conservação, uma vez que o mel é um produto de fácil deterioração em altas temperaturas (Lopes, 2013).

O mel pode ser conservado a temperaturas reduzidas, o que possibilita a conservação do seu valor nutritivo e das características organoléticas (Lopes, 2013). No entanto, a conservação a reduzidas temperaturas não consegue eliminar os microrganismos, bem como a ação das suas toxinas. De facto, este método de conservação apenas retarda a ação dos microrganismos, inativando-os temporariamente. No entanto, em condições favoráveis, estes microrganismos retomam a atividade (Lopes, 2013).

Em relação à temperatura de conservação do mel, pode-se observar que valores de temperatura abaixo de 10 °C atrasam a granulação, visto que o intervalo de temperaturas propício para este processo se situa entre 10 e 18 °C. Para valores de temperatura

compreendidos entre 11 e 21 °C, é possível ocorrer fermentação do mel, enquanto que temperaturas entre 21 e 27 °C não favorecem a fermentação e a granulação. No entanto, para este intervalo de temperaturas, as enzimas presentes no mel são danificadas e a produção de hidroximetilfurfural (HMF) é favorecida, fazendo com que o mel fique mais escuro. A temperaturas superiores a 27 °C os danos no mel são ainda mais rápidos (Lopes, 2013). Deste modo, de uma forma geral, o ideal é o mel ser conservado a temperaturas o mais baixas possível, como 11 °C ou menos que isso, pois assim evita-se que ocorra fermentação (Lopes, 2013).

2.2. Pão de Abelha

Os produtos da apicultura, de uma forma geral, têm vindo a ser reconhecidos pelas suas propriedades nutricionais e farmacológicas. Recentemente, surgiu um interesse acrescido, por parte da comunidade científica, pelo pão de abelha, um produto apícola menos conhecido, mas que também possui essas propriedades (Tomás, 2013). De facto, este interesse é justificado pelo facto do pão de abelha ser um alimento rico nutricionalmente e bastante interessante do ponto de vista da sua atividade biológica (Smati, 2022).

O pão de abelha, ilustrado na **Figura 1**, é um produto apícola que, apesar das suas propriedades nutricionais benéficas, ainda é relativamente desconhecido pelos consumidores. Também é um produto que exige, por parte dos apicultores, algum conhecimento para que se realize a sua extração da colmeia, visto ser um produto que se desfaz facilmente ao ser tocado (Bakour *et al.*, 2022).



Figura 1: A- Favo de mel com pão de abelha; B- Pão de abelha, após extração do favo de mel.

O pão de abelha é uma combinação fermentada de saliva de abelha, pólen vegetal e néctar de cor caramelo. É caracterizado por conter um sabor de frutas cítricas, flores e outras frutas que lhe conferem um sabor picante (Khalifa *et al.*, 2020). Mas nem todos

possuem um sabor picante como descrito na literatura, podemos encontrar pão de abelha com um sabor adocicado e também meio amargo.

Para a sua sobrevivência, as abelhas necessitam de recursos florais de néctar que servem como fonte de carboidratos e de pólen que fornece vitaminas, proteínas, lípidos e minerais. Estas são as duas fontes essenciais de nutrientes para a sobrevivência, procriação e resistência ao stresse (Vaudo *et al.*, 2015). As abelhas, contudo, não se alimentam diretamente do néctar ou do pólen, mas provocam uma série de alterações bioquímicas, fazendo com que o néctar se transforme em mel e o pólen em pão de abelha (Bakour *et al.*, 2022). O pão de abelha é classificado como um alimento funcional, visto que, para além do seu valor nutricional, apresenta diversas características adicionais como a capacidade de curar e preservar, devido às moléculas bioativas que possui na sua composição (Bakour *et al.*, 2022).

2.2.1. Caracterização físico-química

O pão de abelha possui uma composição muito complexa, como se pode verificar na **Tabela 2** (Smati, 2022). É um alimento conhecido pelo seu alto valor nutricional, quando comparado com o mel, por ser rico em vitaminas, minerais essenciais (magnésio, cálcio, potássio e zinco) e compostos fenólicos (Khalifa *et al.*, 2020) como o kaempferol e a quercetina que contribuem ativamente para as propriedades antioxidantes do pão de abelha (Mohammad *et al.*, 2020), hidratos de carbono, proteínas e lípidos (Barta *et al.*, 2022)

Tabela 2: Composição nutricional do pão de abelha. (Khalifa *et al.*, 2020)

Parâmetro	Composição (g/100 g pão-de-abelha)
Conteúdo de água	5,91
Conteúdo lipídico total	7,79
Proteína total	20
Hidratos de carbono	24-35
	Frutose 18,95
	Glicose 11,54
Ácidos gordos	Ácidos gordos saturados de cadeia média(C10-C18) Ácidos gordos saturados de cadeia longa (C20-C24)
Vitaminas	Vitamina B ₁ , B ₂ , B ₇ , C, E, K e P
Magnésio	0,061
Sódio	0,014
Zinco	0,003
Manganês	0,002
Fósforo	0,251

Numa perspetiva qualitativa, a composição química do pão de abelha apresenta algumas semelhanças relativamente à do pólen. No entanto, do ponto de vista quantitativo, é possível identificar algumas diferenças, nomeadamente no que se refere à quantidade de açúcares e de ácido láctico. No caso particular da glucose e sacarose, o pólen apresenta 13,4 e 4,3 g/100g, respetivamente, enquanto que o pão de abelha contém 5,7 g/100g de glucose, não tendo sido detetada sacarose (Barta *et al.*, 2022). Relativamente ao ácido láctico, a quantidade presente no pão de abelha é seis vezes maior do que no pólen (Smati, 2022). Em termos da composição nutricional, o pão de abelha varia de acordo com o valor local e sazonal do pólen, apresenta um valor de proteína e gordura baixo, contém maior variedade de açúcares que o pólen e teores de açúcares redutores mais abundantes (Khalifa *et al.*, 2020). Os teores de tocoferóis são consideráveis, e contém um teor de carboidratos e ácido láctico elevados (Barta *et al.*, 2022). Normalmente, o pão de abelha possui os mesmos ácidos gordos que o pólen (Khalifa *et al.*, 2020). No entanto, o pão de abelha e o pólen têm valores de pH diferentes, em que o pão de abelha tem 4,2 e o pólen fresco tem 7,2, isso por causa da formação de ácido láctico (Smati, 2022).

Como resultado das diferenças em termos da composição, o pão de abelha apresenta uma biodisponibilidade superior à do pólen (Khalifa *et al.*, 2020). Este facto acontece por causa da rutura da parede durante a fermentação láctica que o pólen sofre no interior da colmeia, tornando-o em pão de abelha. Isso faz com que a sua biodisponibilidade aumenta, tendo assim como resultado uma maior absorção através das células epiteliais intestinais humanas (Khalifa *et al.*, 2020).

O pão de abelha proporciona aminoácidos essenciais, ou seja, que o homem não consegue sintetizar, como a metionina, lisina, treonina, histidina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e triptofano (Smati, 2022). Para além disso, contém uma grande variedade de enzimas, nomeadamente a fosfatase ácida, leucina aminopeptidase, β -glicosidase, N-acetil- β -glucosaminidase, α -glicosidase e β -galactosidase (Smati, 2022).

No entanto, tal como referido por Mohammad *et al.* (2020), e conforme ilustrado na **Tabela 3**, a composição química do pão de abelha é bastante diversificada, podendo ser influenciada por fatores como a origem botânica, o tipo de solo, a condição climática, a localização geográfica e as atividades dos apicultores ou tratamentos de armazenamento na produção comercial (Mohammad *et al.*, 2020).

Para além dos compostos referidos anteriormente, o pão de abelha contém ainda uma grande variedade de compostos responsáveis pelo aroma, tal como evidenciado num estudo realizado por Khalifa *et al.* (2020), onde foram identificados vários ácidos alifáticos insaturados, carboidratos, aminoácidos, álcoois, aldeídos, derivados de terpenos, cetonas, nitrilos e furfural (Khalifa *et al.*, 2020).

Tabela 3: A composição química do pão de abelha de alguns países diferentes do mundo (Bakour *et al.*, 2022). (continua)

Componente	Método utilizado	Amostras usadas	Espécie de abelhas	País	
Aminoácidos livres	Fenilalanina, Valina, Histidina, Metionina, Isoleucina, Leucina, Treonina, Alanina, Arginina, Tirosina, Glicina, Prolina Hidroxiprolina, Serina, Ácido Glutâmico, Ácido Aspártico e Lisina	Separção cromatográfica	Quatro amostras multiflorais	<i>Heterotrigona itama</i>	Malásia
	Alanina, Ácido Aspártico, Glutamina, Serina, Leucina, Iso-leucina, Metionina, Treonina, Valina, Triptofano, Cisteína, Fenilalanina, e Prolina.	(GC/MS)	Duas amostras (n.d.)	<i>Apis mellifera</i>	EUA
	Aspartato, Glutamato, Asparagina, Serina, Glutamina, Histidina, Glicina, Treonina, Arginina, Alanina, Ácido γ -aminobutírico, Tirosina, Cisteína, Valina, Metionina, Triptofano, Fenilalanina, Isoleucina Leucina, Lisina e Prolina.	UHPLC	Cinquenta e uma amostras de pão de abelha	<i>Apis mellifera</i>	Inglaterra
Açúcares	Frutose, Glicose, Melezitose e Rafinose	HPLC-RID	Uma amostra (n.d.)	n.i.	Roménia
	Trealose, Glicose e Frutose	HPLC-RID	Uma amostra multifloral	n.i.	Marrocos
Polifenóis	ácido p-cumárico, ácido rosmarínico, miricetina, luteolina, Quercetina e Kaempferol	HPLC-DAD	Uma amostra (n.d.)	n.i.	Roménia
	Hesperetina, Quercetina-O-hexosil-O-rutinosídeo, Quercetina-diglicosídeo, Metil herbacetina-O-di-hexosídeo, Kaempferol-O-di-hexosídeo, Metil herbacetina-O, rutinosídeo, Isorhamnetina-O-pentosil-hexosídeo, Kaempferol-3-O-rutinosídeo, Quercetina-3-O-glicosídeo, Hexosídeo de quercetina-O-malonil, hexosídeo de Kaempferol-O-malonil, Di-p-cumaroilspemidina, Kaempferol-3-O-ramnosídeo e Isorhamnetina-O-desoxihexosídeo	HPLC-DAD-ESI/MS	Três amostras.	n.i.	Portugal

ácido p-cumárico, kaempferol, crisina e apigenina ácido cafeico,	HPLC	Nove simples (n.d.)	n.i.	Lituânia
------------------------------------------------------------------	------	---------------------	------	----------

n.i. – não identificado

Tabela 3: A composição química do pão de abelha de alguns países diferentes do mundo (Bakour *et al.*, 2022). (continuação)

Componente	Método utilizado	Amostras usadas	Espécie de abelhas	País
Ácidos Gordos	GC-MS	Oito amostras monoflorais	n.i.	Peru
	GC-MS	Uma amostra (n.d.)	n.i.	Roménia
Ácidos orgânicos	HPLC-DAD	Uma amostra (n.d.)	n.i.	Roménia
	UFLC-PDA	Uma amostra multifloral	n.i.	Marrocos
Vitaminas	HPLC	Uma amostra (n.d.)	<i>Heterotrigona itama</i>	Malásia
	ICP-AES	Uma amostra multifloral	n.i.	Marrocos
	ICP-MS	Quatro amostras multiflorais	<i>Heterotrigona itama</i>	Malásia

n.i. – não identificado

2.2.2. Caracterização microbiológica

A composição microbiológica de um produto é muito importante para a sua qualidade e conservação. Assim, é importante avaliar e controlar os microrganismos que podem estar presentes no produto, de forma a manter as características originais e transmitir segurança ao consumidor. Por isso, para compreendermos a qualidade microbiológica do pão de abelha, é preciso controlar os microrganismos que estão presentes na transformação do pólen em pão de abelha.

Como consequência da ação microbiana, o pólen é transformado em pão de abelha, através da ocorrência de processos de fermentação levados a cabo principalmente por *Pseudomonas* spp., bactérias do ácido lático e leveduras (AOSAN, 2015). Os microrganismos que podemos encontrar no pão de abelha são transmitidos pela saliva das abelhas e, sendo um produto complexo, pode conter grande variedade de microrganismos, entre bactérias e fungos. É um produto abundante em bactérias lácticas, por exemplo *Apilactobacillus kunkeei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Fructobacillus fructosus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus musae*, *Lactobacillus crustorum* e *Lactobacillus delbrueckii* (Bakour *et al.*, 2022). Estes microrganismos têm uma função fundamental na alimentação e na saúde das abelhas dando-lhe vários nutrientes. Por ser rico em microrganismos probióticos, o pão de abelha é considerado um produto funcional (Bakour *et al.*, 2022).

No entanto, também encontramos fungos na sua composição, como *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Ascosphaera*, *Toxicocladosporium*, *Botrytis*, *Pseudopithomyces*, *Camerosporium*, *Paraconiothyrium*, *Podosphaera*, *Golovinomyces*, *Paraphaeosphaeria*, *Periconia* e *Septoriella* (Bakour *et al.*, 2022; Dimov *et al.*, 2021; Disayathanoowat *et al.*, 2020; Sinpoo *et al.*, 2017).

A quantidade de água presente no pão de abelha fresco pode variar entre 12 e 20%, dependendo bastante da época de colheita, do clima e do manuseamento do produto (Tomás, 2013). Num estudo realizado por Smati (2022), foi utilizado pão de abelha português fresco que apresentou valores de atividade da água e conteúdo em água de 0,57 e 16,5%, respetivamente (Smati, 2022). No entanto, como mostra a **Tabela 4**, os valores da atividade da água também podem variar bastante, dependendo da origem (específica e geográfica) do pão de abelha.

Tabela 4: Comparação da atividade da água (a_w) de pão de abelha produzido por diferentes espécies de abelhas (Mohammad *et al.*, 2020; Smati, 2022).

Espécie de abelha	a_w	Observações	País
<i>Apis mellifera</i>	0,57	Fresco	Portugal
<i>Heterotrigona itama</i>	0,729 a 0,852	Fresco	Brasil
<i>Melipona seminigra</i>	0,910	Fresco	Brasil
<i>Melipona interrupta</i>	0,850	Fresco	Brasil

<i>Melipona scutellaris</i>	0,920 e 0,930	Colhida em diferentes estações do ano: estação seca e estação chuvosa	Brasil
<i>Tetragonula biroii</i>	0,600 a 0,690	Desidratado	Brasil

Considera-se que os microrganismos apenas crescem a uma a_w superior a 0,60 pelo que a secagem do pão de abelha abaixo desse valor faz com que tenha um prazo de validade maior (Mohammad *et al.*, 2020). Já no pão de abelha fresco, a a_w elevada, faz com que tenha maior probabilidade de crescimento de microrganismos, incluindo bactérias patogénicas e os fungos de deterioração, que podem ainda ser responsáveis pela produção de toxinas no produto (Mohammad *et al.*, 2020).

Além do baixo valor de a_w , o fraco acesso de oxigénio ao pão de abelha na colmeia serve também como fator de conservação, pois limita o crescimento de microrganismos aos anaeróbios, como as bactérias lácticas (LAB) e *Bacillus* spp. (Mohammad *et al.*, 2021a).

De acordo com Mohammad *et al.* (2021) o tempo de armazenamento do pão de abelha é outro fator que favorece o crescimento de bactérias. Por isso deve ser controlado de forma adequada, porque ao ser armazenado por muito tempo pode ter uma acumulação de ácido láctico elevado e fazendo com que as bactérias tenham um ambiente desfavorável para o seu crescimento (Mohammad *et al.*, 2021a).

2.2.3. Modo de obtenção e conservação

2.2.3.1. Modo de obtenção

Num trabalho realizado por Khalifa *et al.* (2020), foram avaliados vários métodos para a extração do pão-de-abelha dos favos de mel, nomeadamente métodos manuais como a imersão de favos de mel em água, extração manual por vibração, secagem e separação de grânulos por secagem a vácuo, congelamento, segmentação e filtração de partículas de cera. No entanto, nenhum dos métodos se mostrou particularmente adequado. tendo-se verificado que as imersões em água ocasionavam uma perda de nutrientes considerável (Khalifa *et al.*, 2020).

A nível industrial, é possível realizar a extração do pão de abelha, através de um processo que se encontra dividido em 4 fases distintas (secagem, segmentação, filtração e desinfecção) e que se descreve de seguida (Akhmetova *et al.*, 2012):

Secagem – numa fase inicial, para que a secagem seja feita de forma rápida, deve remover-se a camada de mel que cobre o pão de abelha. De seguida, o pão de abelha é secado a 40 °C, durante 8 a 10 h, até se atingir um teor de humidade de 14 a 15%, seguindo-se uma secagem feita em vácuo a 40 °C, durante 5 a 7 h até se atingir uma humidade de 10%;

Segmentação - nesta etapa, o pão de abelha é congelado à temperatura de -1 °C e, posteriormente, moído com intervalos de moagem de 4, 9 e 5 minutos;

Filtração - após a segmentação, os resíduos de cera são removidos através de uma filtração com recurso a uma máquina de limpeza de sementes;

Desinfecção – por fim, o pão de abelha é sujeito a uma esterilização, usando raios gama e uma mistura de gases, contendo óxido de etileno e de metileno (Akhmetova *et al.*, 2012). No entanto, de acordo com as mais recentes recomendações da União Europeia, esses produtos já não podem ser usados na agricultura.

Com estes processos, é possível obter um maior rendimento, devido ao uso de utensílios apoiados em métodos convectivos e atuais que não destroem o produto (Khalifa *et al.*, 2020), para além de possibilitar a manutenção das suas características nutricionais, nomeadamente no que diz respeito às vitaminas (Akhmetova *et al.*, 2012).

2.2.3.2. Métodos de conservação

Quando nos referimos ao tema “Alimentos”, é necessário ter a maior atenção em termos da qualidade e segurança alimentar, já que são fatores de extrema importância, não só para os produtores, mas também para os consumidores. A qualidade dos alimentos deve ter em conta as características microbiológicas, nutricionais, legais e sensoriais, enquanto que a vertente relacionada com a segurança dos alimentos está diretamente ligada aos problemas/riscos que os mesmos podem causar à saúde do consumidor.

O conceito de prazo de validade pode ser definido como um intervalo de tempo no qual o produto alimentar se mantém seguro, não causando qualquer tipo de dano para a saúde do consumidor, e em condições para o respetivo uso (Man, 2015). Os produtos alimentares, de uma forma geral, e o pão de abelha, em particular, devem ser mantidos em condições ótimas de armazenamento para um consumo sem riscos, possibilitando a manutenção das propriedades microbiológicas, sensoriais, físicas e funcionais pretendidas e devendo corresponder às informações nutricionais explícitas no rótulo. Assim, para um dado produto alimentar é possível definir 3 tipos de prazos de validade

diferentes (microbiológico, químico e organoléptico) que correspondem a diferentes categorias de alterações que se verificam ao longo do respetivo período de armazenamento (Man, 2015).

De forma a uma adequada valorização do pão de abelha é necessário avaliar alguns parâmetros fundamentais, como a sua estabilidade química e microbiológica. Assim, para prolongar o tempo de prateleira do pão de abelha é preciso criar formas de conservação próprias para obter um alimento com uma qualidade microbiológica superior, mas simultaneamente mantendo as suas características físico-químicas e bioativas (Smati, 2022).

A conservação do pão de abelha é muito fácil, quando comparada com a conservação do pólen. De uma forma resumida, é necessária uma secagem para reduzir o teor de humidade, fazendo com que não se registre o crescimento de bolores (Tomás, 2013), devendo ser conservado a uma temperatura de 5-8 °C, perfeitamente fechado (Khalifa *et al.*, 2020). Mas o pão de abelha também pode ser armazenado no congelador ou até mesmo agregado junto com o mel (Tomás, 2013). Para evitar que o pão de abelha capte humidade, pode-se armazenar em dessecadores, de modo a evitar reações dos constituintes do pão de abelha com a água, o que iria reduzir significativamente o seu tempo de prateleira, devido à ocorrência de processos de fermentação (Khalifa *et al.*, 2020). De acordo com Tomás (2013), a concentração do pão de abelha no mel não pode ser superior aos 15%. Essa mistura pode ser consumida de forma direta ou misturada com outros alimentos, como por exemplo iogurtes, saladas, entre outros, caracterizando-se por um sabor adocicado e sendo mais fácil de ingerir do que o pólen (Tomás, 2013).

Apesar da importância que o pão de abelha tem vindo a conquistar, a pesquisa bibliográfica realizada para a elaboração deste relatório evidenciou que, na maioria dos casos, o processo de conservação deste produto apícola se resume à utilização de um número reduzido de métodos, como é o caso da conservação à temperatura ambiente e conservação a temperatura reduzida.

Num estudo feito por Smati (2020), foram avaliados vários métodos para a conservação da qualidade microbiana do pão de abelha, nomeadamente o congelamento, a liofilização, a secagem no forno e a conservação à temperatura ambiente. O trabalho realizado permitiu concluir que a secagem no forno e a conservação à temperatura ambiente foram os métodos que possibilitaram a obtenção de melhores resultados. A secagem no forno e a conservação à temperatura ambiente foram capazes de manter a

estabilidade microbiana do pão de abelha por, pelo menos, seis meses de armazenamento, enquanto que a liofilização e o congelamento não apresentaram resultados satisfatórios na conservação da qualidade microbiana do pão de abelha (Smati, 2022).

2.2.4. Benefícios e valorização

Como referido anteriormente, o pão de abelha é um alimento rico em proteínas, açúcares, aminoácidos essenciais e ácidos gordos (Tomás, 2013). Contém ainda diversas substâncias bioativas, possuindo um valor nutritivo elevado, que a nível da saúde humana tem um efeito positivo (Mărgăoan *et al.*, 2019). Segundo alguns estudos, tem um elevado potencial apresentado como suplemento alimentar, atuando na prevenção e tratamento de várias doenças (Tomás, 2013) e tendo sido reportado como anti-inflamatório, anticancerígeno, antinociceptivo (tem a capacidade de parar a dor), para além de possuir propriedades antidiabéticas (Mohammad *et al.*, 2021b).

O pão de abelha tem uma ação positiva no sistema imunitário, parecendo contribuir para uma melhor memória e concentração dos indivíduos que o incluem na sua alimentação (Smati, 2022). Alguns estudos também referem o elevado valor de vitamina B, bem como o seu papel no fornecimento de energia quando usado numa atividade física (Smati, 2022). Atua também em casos de depressão e inflamação do córtex cerebral. Possui ainda um poder regulador do sistema digestivo, auxiliando em doenças, como a colite, constipação, diarreia, para além de ativar o apetite (Smati, 2022).

Outros efeitos benéficos atribuídos ao pão de abelha incluem o combate a problemas da próstata em homens (Smati, 2022). Auxilia também na melhoria dos níveis elevados de colesterol no sangue, mantendo-o equilibrado, ajuda no desempenho do fígado, da vesícula biliar e da pressão arterial. Para além disso, está provado que ajuda no envelhecimento e na anemia, devido às suas características antioxidantes (Smati, 2022).

Bakour *et al.* (2022), realizaram diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* onde ficaram evidentes as propriedades farmacológicas de amostras de pão de abelha de diversas origens geográficas. Este estudo demonstra que existe um vasto campo para a exploração dos efeitos benéficos do pão de abelha ao nível da saúde do consumidor, quando incluído numa alimentação diversificada e equilibrada (Bakour *et al.*, 2022).

No passado, o pão de abelha era um produto totalmente desconhecido pelos consumidores. Mas recentemente, o pão de abelha tem vindo a despertar algum interesse

junto dos consumidores, como resultado da divulgação de alguns estudos científicos que reportam as potencialidades deste produto da colmeia. Para além da publicação de estudos com informação sobre a composição e propriedades do pão de abelha, uma outra forma de valorizar este produto é o desenvolvimento de novos produtos onde o pão de abelha seja incorporado. Um exemplo desta estratégia é o trabalho realizado por Vilares (2020), onde se desenvolvem barras energéticas com incorporação de produtos apícolas como o pólen apícola e o pão de abelha (Vilares, 2020). No entanto, ao contrário do que sucede, por exemplo com o mel e o pólen apícola, ainda existe um longo caminho a percorrer no que se refere à valorização do pão de abelha. Assim, este trabalho pretende dar mais um contributo nesse sentido, através da preparação de um produto diferenciado, neste caso misturas de mel com pão de abelha, e avaliação da respetiva estabilidade ao longo do armazenamento.



Capítulo 3

- 3. Materiais e métodos
 - 3.1. Preparação das matérias-primas
 - 3.2. Preparação da mistura
 - 3.3. Plano de amostragem
 - 3.4. Métodos analíticos

3. Materiais e métodos

3.1. Preparação das matérias-primas

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram recolhidos favos de mel, proveniente da região do Nordeste Transmontano, e de mel de Rosmaninho proveniente da região do Algarve.

Após a recolha do favo de mel, procedeu-se à sua extração do pão de abelha do interior do favo e à sua limpeza, utilizando o equipamento ilustrado na **Figura 2**.

De seguida, o pão de abelha foi armazenado no congelado de forma a conservá-lo até proceder a mistura do pão de abelha com mel.



Figura 2: Máquina usada para a extração do pão de abelha do favo.

3.2. Preparação da mistura

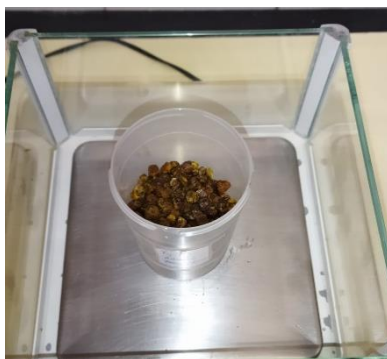
Após a extração do pão de abelha, prepararam-se as misturas com o mesmo juntamente com o mel.

As misturas foram preparadas em frascos estéreis diferentes, para os 6 meses de análises (em triplicados) de forma a evitar a contaminação e que alguns tenham mais pão de abelha ou mel do que os outros. Para cada frasco foi pesado cerca de 40,8 g de pão de abelha e 95 g de mel. A mistura correspondia a uma proporção de 30 % de pão de abelha e 70 % de mel. A escolha da proporção foi definida tendo por base uma avaliação prévia da aceitabilidade do produto.

De seguida, os frascos foram armazenados em prateleiras à temperatura ambiente e estiveram expostos a luz, para refletir as condições normais no mercado. As misturas foram analisadas em diferentes tempos de armazenamento:

- imediatamente após a preparação da mistura (tempo de armazenamento 0);
- um mês após a preparação da mistura (1 mês de armazenamento);
- três meses após a preparação da mistura (3 meses de armazenamento);
- seis meses após a preparação da mistura (6 meses de armazenamento).

Pão de abelha



Mel



Mistura de pão de abelha e mel

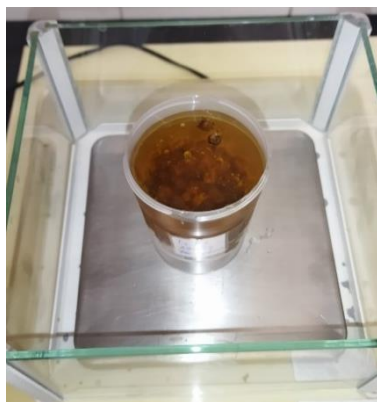


Figura 3: Preparação da mistura de pão de abelha e mel.

3.3. Plano de amostragem

3.3.1. Matérias-primas

As matérias-primas, tanto o mel como o pão de abelha, foram caracterizados para os mesmos parâmetros físico-químicos e também microbiológicos. Mas nas físico-químicas, o teor de gordura foi avaliado somente no pão de abelha, já que o mel não possui teor de gordura na sua composição.

As matérias-primas foram caracterizadas quanto aos seguintes parâmetros físico-químicos e microbiológicos e descritos nas secções **3.4.1** e **3.4.2**:

Físico- químicos:

- cor;
- pH;
- acidez livre;
- teor de humidade;
- atividade da água
- teor de proteínas;
- teor de gorduras;
- teor de cinzas;
- teor de hidratos de carbono;
- teor de açúcares;
- compostos fenólicos totais;
- flavonóides;
- atividade antioxidante.

Microbiológicos:

- mesófilos aeróbios;
- bolores e leveduras;
- coliformes totais;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*;
- esporos de clostrídios sulfitos redutores;
- bactérias do ácido láctico.

3.3.2. Mistura

Antes da realização das análises das misturas, as amostras foram homogeneizadas, usando um Ultra-Turrax com a velocidade de 6500 t/min, em ambiente asséptico, de forma a garantir que não existisse qualquer contaminação das mesmas durante o processo.

As misturas foram analisadas relativamente aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos descritos nas secções 3.4.1 e 3.4.2. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

Mistura

Físico- químicos:

- cor;
- pH;
- acidez livre;
- teor de humidade
- atividade da água;
- teor de cinzas;
- teor de proteínas;
- teor de gorduras;
- teor de hidratos de carbono;
- teor de açúcares;
- compostos fenólicos totais;
- flavonóides;
- atividade antioxidante.

Microbiológicos:

- mesófilos aeróbios;
- bolores e leveduras;
- coliformes totais;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*;
- esporos de clotridios
- sulfitos redutores;
- bactérias do ácido láctico.



Figura 4: Homogeneização da mistura para análise.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Parâmetros físico-químicos

3.4.1.1. Análise polínica

Este parâmetro foi avaliado apenas para as matérias-primas. Para a análise polínica do pão de abelha, o método utilizado para a sua identificação foi o método acetolítico, que se descreve brevemente de seguida. Num tubo, colocou-se aproximadamente 1 g de pão de abelha e 1 g de mel, previamente homogeneizado com recurso ao almofariz, adicionando água destilada de modo a amolecer um pouco, e agitou-se vigorosamente num vortex. De imediato, foram retirados 200 µL desta mistura, colocados num outro tubo e submetidos a uma centrifugação de 1000 g durante 5 minutos. O sedimento resultante foi sujeito a acetólise (Louveaux *et al.*, 1978; Vilares, 2020), com as modificações recomendadas (Ohe *et al.*, 2004; Vilares, 2020). Procedeu-se à identificação e contagem polínica num microscópio ótico com objetiva de imersão. Foram contados mais de 1200 grãos por preparação (Vergeron, 1964; Vilares, 2020). Esta análise foi realizada com o apoio do *LabApis*^{UTA}.

Para a análise polínica do mel, foram utilizados 10 g da amostra de mel que foi dissolvida em 20 mL de água destilada e centrifugada a 3500 rpm durante 10 min. Depois de descartar o líquido sobrenadante, foi adicionado 2 mL de ácido acético glacial e agitado num vórtex. O tubo foi centrifugado nas mesmas condições e o líquido sobrenadante eliminado. Em seguida, foram adicionados 2 mL da solução de acetólise (anidrido acético e ácido sulfúrico, na proporção de 9:1) e a solução foi agitada no vórtex (Louveaux *et al.*, 1978; Mouffok, 2021). O tubo foi colocado num banho de água a ferver durante 3 minutos. Após arrefecimento e centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e foram adicionados 4 ml de solução de glicerol a 50 %, seguindo-se outra etapa de centrifugação e remoção do sobrenadante. De seguida, foi adicionado um volume de glicerol-gelatina e imediatamente agitado em vórtex. Posteriormente, foram pipetados 17 µL da mistura e espalhados numa lâmina a 40 °C. As lâminas foram deixadas em repouso, à temperatura ambiente, numa posição invertida. Depois de selar as lamelas com verniz para unhas, as lâminas foram observadas ao microscópio ótico, com uma ampliação de 1000X, tendo sido contados e identificados aleatoriamente 500-1000 grãos de pólen por amostra e

linhas completas na área da lamela (Louveaux *et al.*, 1978; Mouffok, 2021). Este trabalho foi realizado com o apoio do *LabApis^{UTAD}*.

3.4.1.2. Determinação da cor

O parâmetro cor foi avaliado, com recurso a um colorímetro portátil, no pão de abelha, bem como na mistura do pão de abelha com o mel. Foi utilizado um Colorímetro portátil CR-400 / CR-410 (**Figura 5a**), que é previamente calibrado, obtendo-se as coordenadas da cor do sistema de escala *CieLAB*. Neste sistema o valor de L, representa a luminosidade, em que quanto maior o seu valor, mais clara é a amostra analisada, o a^* corresponde à variação da gama de cor entre vermelho (+) e verde (-), o b^* corresponde à gama entre amarelo (+) e azul (-), o C^* corresponde à intensidade ou pureza da cor e, por fim, o h (tonalidade) que permite uma determinação precisa da cor tridimensionalmente.

No caso do mel, a sua cor foi avaliada através de análise colorimétrica. A amostra de mel foi colocada em cuvete e analisada de seguida pelo colorímetro C221 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) (**Figura 5b**). Os méis foram classificados de acordo com a escala de Pfund, diretamente através da leitura no instrumento de medida (Lopes, 2014). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.



Figura 5: Determinação da cor: (a) - Colorímetro portátil CR-400 / CR-410; (b) - Colorímetro C221

Fonte (a): <https://sensing.konicaminolta.us/wp-content/uploads/picturetwo-kzip041t20.png>

3.4.1.3. Determinação do pH e acidez livre

A determinação da acidez livre foi feita através de um titulador automático AQUA LAB (**Figura 6**). Para a amostra de mel, foi utilizado o procedimento que se encontra referenciado pela International Honey Commission (IHC). Inicialmente, foi preparada uma solução dissolvendo 10 g de mel em 100 mL de água desionizada. Para a mistura o procedimento foi feito da mesma forma que o mel. De seguida, pipetou-se 25 mL desta

solução para um matraz onde se colocou o elétrico de pH, registrando o valor inicial de pH, e procedendo-se de seguida à titulação desta solução com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol.dm⁻³. O volume de base gasto para atingir o ponto de equivalência (pH=7) foi registado. O valor obtido permite determinar a acidez livre que é a medida obtida pela titulação com hidróxido de sódio (NaOH) até ao ponto de equivalência (pH=7). Para o pão de abelha, o procedimento foi semelhante, mas a quantidade de amostra pesada foi de 5 g para 50 mL de água desionizada, e foi levado a um agitador antes de medir a acidez livre, para que o pão de abelha pudesse dissolver. (Bogdanov, 2002).



Figura 6: Titulador automático

3.4.1.4. Teor de humidade

O teor de humidade do pão de abelha e da mistura foi determinado através de balança de infravermelho a 105 °C (**Figura 7a**), usando uma massa de amostra de 2 g. Este procedimento foi feito em triplicado e os resultados foram expressos em percentagem (%) (Tomás, 2013; Vilares, 2020).

O teor de humidade na amostra de mel foi analisado diretamente por refratometria (**Figura 7b**). A análise foi feita em triplicado.

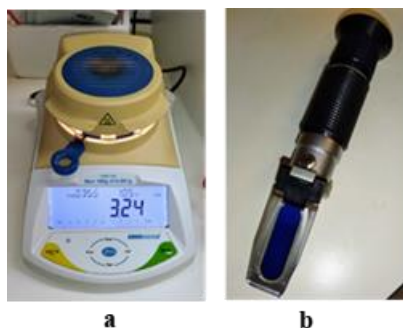


Figura 7: Determinação do teor de humidade; (a) – Balança de humidade; (b) – Refratómetro

3.4.1.5. Atividade da água

A atividade da água (a_w) nas amostras de mel, de pão de abelha e da mistura foram medidas através de um medidor de atividade de água, baseado na determinação do ponto de orvalho 4TE (**Figura 8**). O valor obtido na determinação do ponto de orvalho é medido em temperatura e depois traduzida em atividade de água. As análises foram feitas em triplicado (Smati, 2022).



Figura 8: Medidor de atividade da água

Fonte: https://eqlabecuador.com/wp-content/uploads/2019/12/4te_duo-525x350.png
https://img.directindustry.com/pt/images_di/photo-g/64142-8601310.jpg

3.4.1.6. Teor de proteína

O conteúdo de proteína das matérias-primas e da mistura foram avaliados pela determinação do teor total de azoto, através do método de Kjeldahl (**Figura 9**). De uma forma resumida, foram pesados 0,5 g de amostra, para os tubos de determinação das proteínas, onde se adicionou 15 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1g (correspondente a 2 pastilhas) do catalisador metálico ((Cu) 9% em $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Os tubos foram transferidos para o digestor de proteínas (**Figura 9a**), onde permaneceram até alcançar uma temperatura de 400 °C, aguardando-se a reação de oxidação, indicada pelo aparecimento da cor verde (Vilares, 2020).

Após a digestão, os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente e seguiram para o destilador de azoto (**Figura 9c**). Inicialmente a amostra foi diluída com água destilada, o excesso de ácido sulfúrico neutralizado com hidróxido de sódio a 40% e o azoto total, destilado na forma de amoníaco, foi misturado com 10 mL de ácido bórico a 0,5% (v/v) com indicador misto, verde de bromocresol e vermelho de metilo. Na sequência a solução obtida foi titulada com solução de HCl com uma concentração de 0,5 mol/L, até atingir o ponto de viragem identificado pela passagem de coloração azul para a rosada. Para a conversão do teor de azoto em proteína total foi utilizado um fator de

6,25, exprimindo-se os resultados em percentagem de proteína (Helrich, 1990; Tomás *et al.*, 2017).

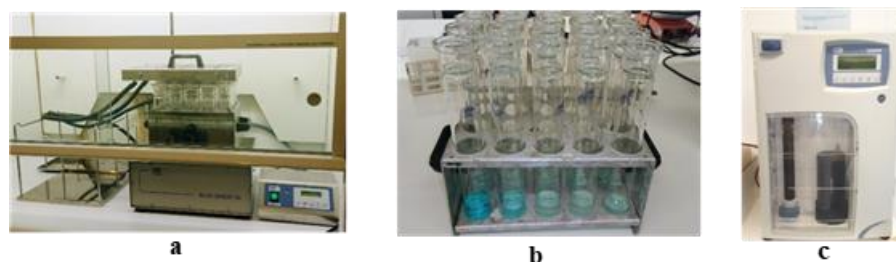


Figura 9: Método de Kjeldahl: (a) - Digestor de proteínas; (b) - Após a digestão; (c) - Destilador de azoto

3.4.1.7. Teor de gordura

O teor de gordura do pão de abelha e da mistura foram realizadas através de uma extração sólido-líquido utilizando como solvente extrator éter de petróleo. O processo de extração foi realizado num sistema de Soxhlet (**Figura 10**), durante 4 horas, utilizando uma quantidade de amostra aproximadamente 2 g. Após a extração, a solução foi levada à secura num evaporador rotativo. De seguida, o resíduo foi pesado, sendo o resultado final é expresso em percentagem. A análise foi feita em triplicado (Smati, 2022).



Figura 10: Determinação do teor de gordura bruta, através de extração em Soxhlet.

3.4.1.8. Teor de cinzas

O teor de cinzas do pão de abelha e da mistura foram determinados através do método gravimétrico após incineração a 550 °C durante 4 horas, usando uma massa de 2 g de amostra (**Figura 11**) (Nyau *et al.*, 2016; Vilares, 2020). Antes do processo de incineração a 550 °C, a mistura de pão de abelha com mel passou por um pré-aquecimento, até apresentarem uma coloração mais escura, numa placa de aquecimento, de forma a eliminar de uma forma suave a quantidade de água presente, evitando assim o seu derrame na mufla (Sakač *et al.*, 2019). Após arrefecer, o cadinho foi pesado de forma a determinar

o conteúdo em cinzas. As amostras foram analisadas em triplicado e o resultado final é expresso em porcentagem (Nyau *et al.*, 2016; Vilares, 2020).

O teor de cinza no mel foi avaliado, de forma indireta, através da equação referida abaixo, com recurso à condutividade (Vilares, 2020):

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\frac{\text{Valor da condutividade}}{1000} - 0,14}{1,74}$$

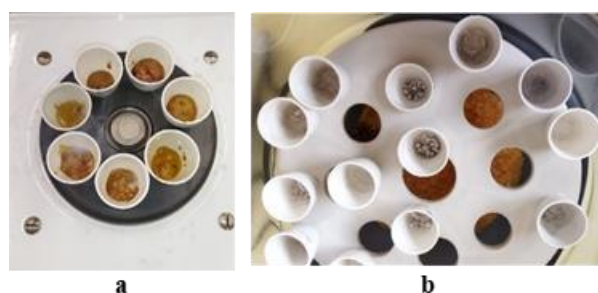


Figura 11: Determinação do teor de cinzas: (a) - Pré-aquecimento das amostras; (b) - incineração a 550 °C

3.4.1.9. Hidratos de carbono

A determinação da quantidade de hidratos de carbono presentes nas matérias-primas e na mistura foram avaliadas por diferença, usando a expressão definida na literatura, e expressa em porcentagem (Caveiro, 2017):

Hidratos de carbono (%) = 100 – (%humidade + % cinzas + % proteínas + % lípidos).

3.4.1.10. Açúcares

3.4.1.10.1. Preparação das amostras

A determinação dos açúcares livres foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI). Para isso, foi pesada 1 g de amostra de pão de abelha para um tubo falcon de 15 mL. De seguida foram adicionados 6,3 mL de água e 2,1 mL de acetonitrilo à amostra, homogeneizando-se de seguida em vórtex a suspensão obtida. Logo após, foram adicionados 0,2 mL dos Reagentes de Carrez I e de Carrez II, sendo a amostra imediatamente misturada após a adição destes reagentes. Em seguida, a mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 3000 g, para a eliminação do sedimento proteico, tendo-se depois retirado 5 mL do sobrenadante resultante, que foi transferido para um novo tubo falcon de 15 mL e desengordurado com a adição de 5 mL de hexano. A amostra foi homogeneizada em vórtex durante 1 minuto, após a adição de hexano, e centrifugada por 10 minutos a 3000 g. A camada de hexano é removida e este passo é repetido três vezes. A camada inferior final desengordurada e contendo os açúcares foi filtrada com um filtro de seringa Nylon de 0,22 µm para um vial e injetada no sistema HPLC-R (ISO, 2023).

3.4.1.10.2. Condições Cromatográficas

A quantificação dos açúcares foi feita num cromatógrafo integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex). Para a separação cromatográfica foi usada uma coluna 100-5 NH2 Eurospher (4,6 x 250mm, 5mm, Knauer) operando a 35°C (forno Grace 7971 R). A fase móvel foi uma mistura de acetonitrilo/água 80:20 (v/v), com um caudal de 1,3mL/min (Tomás *et al.*, 2017). A identificação e quantificação dos açúcares foi obtida por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões, nomeadamente frutose, glucose, sacarose, maltulose, maltose, trealose, melezitose, rafinose, isomaltose e erlose. As análises das amostras foram realizadas em triplicado e os resultados expressos em percentagem (%) (Vilares, 2020).

3.4.1.11. Análise de compostos fenólicos

3.4.1.11.1. Extração dos compostos fenólicos

Para a extração dos compostos fenólicos, utilizaram-se 4 g de amostra do pão de abelha, ou da mistura de pão de abelha e mel, que de seguida foram misturados com 80 mL de etanol/água (80%, v/v), num gobelé à temperatura ambiente, e levados a um homogeneizador de ultrassons (**Figura 12a**) de forma contínua, durante 20 min. Ao longo do processo o gobelé ficou imerso em água, sendo a temperatura controlada e mantida constante a 25 °C, com a ajuda de um termómetro. Após isso, a mistura foi filtrada por gravidade com papel de filtro, e posteriormente levada a um evaporador rotativo, para eliminação do etanol. De seguida, o extrato obtido foi congelado para posterior liofilização. Depois de liofilizados, os extratos (**Figura 12b**) foram armazenados à temperatura ambiente num exsiccador, para posterior análise (Aylanc *et al.*, 2022). O mel foi feito de forma direta, onde se utilizou 1 g de mel, e de seguida foi dissolvido em 10 mL de metanol para poder realizar a análise dos compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante.

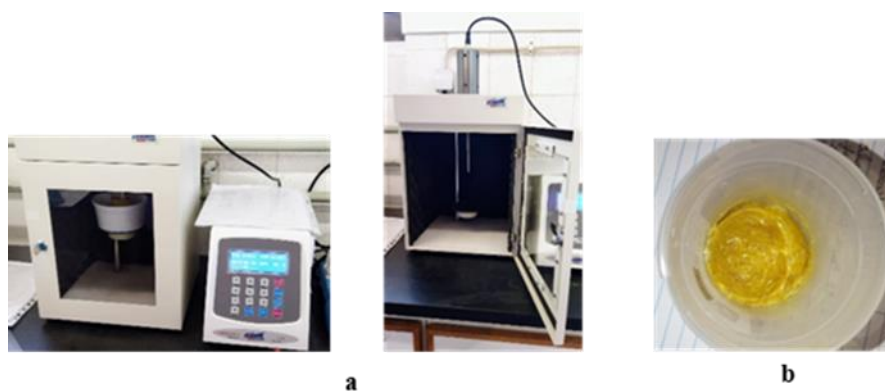


Figura 12: Extração dos compostos fenólicos; (a) - homogeneizador de ultrassons; (b) – amostra fiofilizada

3.4.1.11.2. Teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu utilizando como padrão o ácido gálico. Foi utilizado 0,5 mL de extrato de etanol (1mg/mL), de seguida foram adicionados 0,25 mL de reagente Folin-Ciocalteu, depois de 3 min foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio saturado (Na_2CO_3 a 20%), e posteriormente, perfaz-se o volume com água desionizada até um volume final total de 5 mL. Logo em seguida, a solução foi levada a um banho aquecido a 70 °C por 10 min, após isso foi arrefecida no escuro durante 30 min, tendo-se feito o registo da leitura a uma absorvância de 760 nm no espectrofotómetro. A quantificação foi feita com recurso a uma curva de calibração de ácido gálico com soluções na faixa de concentrações de 0,007-0,125 mg/mL ($y = 9,85x + 0,07$; $R^2 = 0,992$). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato (mg GAE /g de extrato) (Aylanc *et al.*, 2022; Smati, 2022). As análises foram feitas em triplicado.

3.4.1.11.3. Teor total de flavonóides

O teor total de flavonoides foi determinado através da preparação de uma solução de AlCl_3 a 2%, diluída em ácido acético glacial a 5 % e metanol. De seguida, retirou-se 0,2 mL desta solução e adicionaram-se 0,2 mL de etanol e 2,8 mL de ácido acético/metanol a 5 %. A mistura obtida foi homogeneizada, colocada no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente, tendo-se de seguida procedido ao registo do valor da absorvância a 415 nm. A quantificação foi feita através da construção de uma curva de calibração de quercetina com soluções de concentração na faixa de 0,003-0,1 mg/mL ($y = 9,85x + 0,07$; $R^2 = 0,992$). Os ensaios foram realizados em triplicado, tendo-se expresso os resultados em miligramas de equivalente de quercetina (QE) por g de amostra (mg QE/g de amostra) (Aylanc *et al.*, 2022; Smati, 2022).

3.4.1.11.4. Atividade antioxidante (efeito bloqueador de radicais livres DPPH)

A determinação da atividade antioxidante foi realizada através da avaliação do efeito bloqueador de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH). Para tal, usaram-se 0,70 ml do extrato obtido em 3.3.11.1, adicionando-se de seguida 1,93 ml de solução de DPPH, em metanol. De seguida, a mistura obtida foi homogeneizada e colocada no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 min. Finalmente, a absorvância foi medida a

515 nm no espectrofotômetro. As amostras foram analisadas em triplicado. A atividade antioxidante foi expressa em termos da porcentagem de inibição de radicais, calculada através da seguinte equação (Aylanc *et al.*, 2022):

$$\% \text{ de inibição} = \frac{Ac - Ae}{Ac} * 100$$

Ac – Absorvância do branco

Ae – Absorvância da amostra

3.4.2. Parâmetros microbiológicos

As amostras de mel, pão de abelha e mistura foram preparadas seguindo o procedimento descrito na ISO 6887-1:2003(ISO, 2003a). Em condições estéreis, 10 g de cada amostra, foram homogeneizadas em 90 mL de água tamponada esterilizada com peptona. A mistura foi colocada em sacos esterilizados e homogeneizada num Stomacher durante 1 minuto. As diluições decimais foram feitas usando o mesmo diluente.

3.4.2.1. Aeróbios mesófilos

A enumeração dos aeróbios mesófilos foi analisada como descrito na ISO 4833:2003 (ISO, 2003a). O método aplicado foi por incorporação, em duplicado, em que se pipetou 1 mL de cada diluição para uma placa Petri de 9 cm, verteu-se cerca de 20 mL de Plate Count Agar (PCA, Biolife), e homogeneizou-se. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas, em posição invertida. As contagens microbianas foram expressas como unidades formadoras de colônias por grama das amostras utilizadas (UFC/g), utilizando a fórmula (ISO, 2003a):

$$\text{UFC/g} = \frac{\Sigma C}{V * (n1 + n2 * 0,1) * d}$$

ΣC - soma das colônias contadas em todas nas placas contabilizáveis

V - volume de inóculo inoculado usado em cada placa

n1 - número de placas da primeira diluição contadas

n₂ - número de placas da segunda diluição contadas

d - diluição a partir da qual foram obtidas as primeiras contagens

3.4.2.2. Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras foram analisados como descrito na ISO 21527-2:2008 (ISO, 2008). O método aplicado foi espalhamento, em que se espalhou 200 µL de cada suspensão na superfície do meio de cultura de Dicloran Glycerol 18% agar (DG18, Liofilchem), em duplicado. As placas de Petri foram incubadas a 25 °C durante 5 dias, em posição normal. As colónias de leveduras foram contadas após 2 dias e as colónias de bolores após 5 dias de incubação e os resultados foram expressas em UFC/g (ISO, 2008).

3.4.2.3. *Staphylococcus aureus*

As contagens de *Staphylococcus aureus* foram realizadas através de diluições decimais e sementeira em placas Compact Dry S-XA (r-biopharm). Foi utilizado 1 mL de amostra de cada diluição e semeado em placas de Compact Dry, em duplicado. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/g.

3.4.2.4. Esporos de clostrídios sulfito-redutores

A contagem de esporos clostrídios sulfito-redutores foi realizada de acordo com o método descrito na ISO 15213:2003 (ISO, 2003b). Pipetou-se 5 mL da suspensão inicial para um tubo Falcon de 50 mL (em duplicado) e mergulhou-se o tubo em banho a 80 °C por 10 min (partir do momento em que a amostra atingiu aquela temperatura). Como controlo da temperatura, foi usado um tubo Falcon de 50 mL com 5 mL de água destilada, onde se mergulhou um termómetro. Quando o controlo atingiu os 80 °C, começou-se a contar 10 min. Após os 10 min, mergulhou-se os tubos de imediato em água fria. Depois de arrefecerem, adicionou-se cerca de 25 mL de meio de cultura Iron Sulfite Modified Agar (ISA) e deixou-se solidificar. Após o meio solidificado verteu-se o restante meio de cultura ao tubo até atingir 50 mL, para criar condição de anaerobiose. Os tubos Falcon foram incubados a 30 °C durante 48 horas. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/g (ISO, 2003b).

3.4.2.5. Bactérias do ácido láctico

A contagem das bactérias lácticas foi realizada de acordo com o método descrito na ISO15214:1998 (ISO, 1998). O método aplicado foi incorporação, em que se pipetou-se 1 mL de cada diluição para uma placa de Petri de 9 cm contendo cerca de 20 mL de Agar Sharp Man Rogosa (MRS, Liofilchem) com cicloheximida (20 mg/L), em duplicado. De seguida foi homogeneizada e, após solidificado, as placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante 72 horas, em posição invertida. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/g (ISO, 1998).

3.4.2.6. Coliformes e *E.coli*

As contagens dos coliformes e *E. coli* foram realizadas através de diluições decimais e sementeira em placas Compact Dry EC (r-biopharm). Foi utilizado 1 mL de amostra de cada diluição e semeado em placas de Compact Dry, em duplicado. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/g.



Capítulo 4

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das matérias-primas e da mistura

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das matérias-primas e da mistura

4.1.1. Análise polínica do mel e do pão de abelha

A análise polínica é uma ferramenta que permite identificar as espécies botânicas que estiveram na base da produção pelas abelhas do mel e do pão de abelha e, deste modo, determinar a respetiva origem floral. Na Tabela 5, apresentam-se os resultados da análise polínica das amostras de mel e de pão de abelha usadas na preparação da mistura de pão de abelha com mel. Os resultados obtidos mostram que foi possível identificar várias famílias botânicas, presentes em diferentes proporções, expressas em termos de percentagem.

Considerando os resultados obtidos, fica claro que as amostras de pão de abelha possuem características florais diferentes que identificam com sucesso pólenes originários de 19 famílias, mas foram contabilizados os valores superiores a 3%. Na **tabela 5** apresenta-se as famílias maioritárias encontradas no pão de abelha, que são a *Fabaceae* e *Rosaceae*, e pertence as seguintes espécies botânicas: *Castanea sativa* e *Rubus* sp. (**Anexo**).

O mel pode ser produzido a partir de uma variedade de espécies de plantas, pois o néctar é coletado de fontes vegetais disponíveis perto do apiário (Mouffok, 2021). Para o mel foram encontradas características florais diferentes também que identificam os pólenes originários de 21 famílias, mas foram contabilizados os valores superiores a 5%. Na **tabela 5** apresenta-se as famílias maioritárias encontradas no mel, que são a *Fabaceae* e *Lamiaceae*, e pertence as seguintes espécies botânicas: *Genista hirsuta sativa* e *Lavandula* sp. (**Anexo**).

Tabela 5: Análise polínica das amostras de mel e pão de abelha (expresso em porcentagem).

Família	Amostras	
	Mel	Pão de Abelha
<i>Boraginaceae</i>	5,25	3,48
<i>Campanulaceae</i>	-	6,67
<i>Fabaceae</i>	38,19	3,67
<i>Fagaceae</i>	-	44,44
<i>Lamiaceae</i>	33,72	-
<i>Resedaceae</i>	-	5,41
<i>Rosaceae</i>	-	13,91

4.1.2. Caracterização físico-química

Nesta parte serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização físico-química das matérias-primas (mel e pão de abelha) e da mistura do pão de abelha com mel. Foram avaliados os seguintes parâmetros: umidade, proteínas, gorduras, cinzas, cor, atividade de água, pH, acidez livre, teor de hidratos de carbono, açúcares (frutose e glucose), compostos fenólicos (fenólicos totais e flavonoides) e atividade antioxidante.

4.1.2.1. Cor

A cor do mel é uma propriedade física essencial, que varia de acordo com a origem floral, do processamento e armazenamento, bem como de fatores climáticos durante o fluxo do néctar e da temperatura durante o amadurecimento do mel na colmeia (Ribeiro *et al.*, 2010). A coloração do mel também pode ser um reflexo de algumas alterações sofridas pelo mel, durante o período de armazenamento ou aquecimento (Mouffok, 2021), como é o caso da reação de Maillard, que é uma reação de escurecimento não enzimático.

Para além da cor ser um parâmetro de valorização do produto, é também o elemento que exerce alguma influência na escolha do produto por parte do consumidor (Ribeiro *et al.*, 2010).

Segundo Mouffok (2021), a cor do mel varia do incolor ao castanho-escuro, estando também associada ao sabor. De uma forma geral, os méis com uma coloração mais clara apresentam um sabor suave, ao passo que os méis mais escuros apresentam um

sabor já mais forte. Na verdade, os méis mais claros têm uma maior aceitação por parte do consumidor, o que resulta em preços mais elevados em detrimento dos méis mais escuros, embora esta característica não se traduza necessariamente num produto de maior qualidade (Lopes, 2014).

No presente trabalho, as amostras de mel utilizadas na preparação da mistura com o pão de abelha apresentaram valores compreendidos entre 43 mm e 45 mm na escala Pfund, a que corresponde uma cor âmbar extra clara, como se mostra na **Tabela 6**.

Tabela 6: Cores padrão do mel e seus respectivos intervalos da escala mm Pfund (Possebon, 2022)

Cores padrão do mel	Intervalos de cor da escala mm Pfund
Branco água	≤ 8
Extra Branco	>8 e ≤ 17
Branco	>17 e ≤ 34
Âmbar extra claro	>34 e ≤ 50
Âmbar	>85 e ≤ 114
Âmbar escuro*	>114

(*) Geralmente classificado como mel escuro

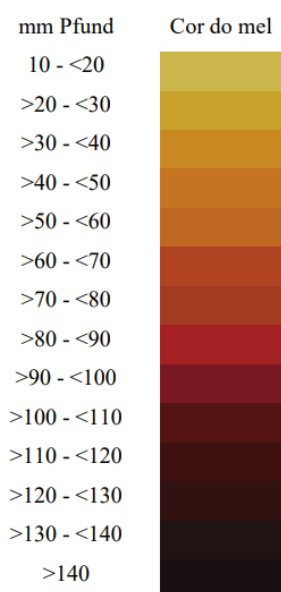


Figura 13: Escala de cores do mel com seus respectivos valores de mmPFund (Possebon, 2022).

No caso do pão de abelha, a cor foi avaliada utilizando o sistema CieLAB, sendo avaliados os parâmetros L* [corresponde à luminosidade ou ao tom da cor do produto, variando de zero (negro) a cem (branco)], b* [corresponde à gama entre amarelo (+) e azul (-)], a* [corresponde à variação da gama de cor entre vermelho (+) e verde (-)], C*

(corresponde à saturação) e h (corresponde ao ângulo de tonalidade). Os valores registados para estes parâmetros são apresentados na **Figura 14**. O pão de abelha apresentou valores de L^* , a^* , b^* , C^* e h compreendidos entre 45,8, 11,5, 24,7, 27,3 e 64,2. O pão de abelha apresentou ter uma cor castanho escuro.

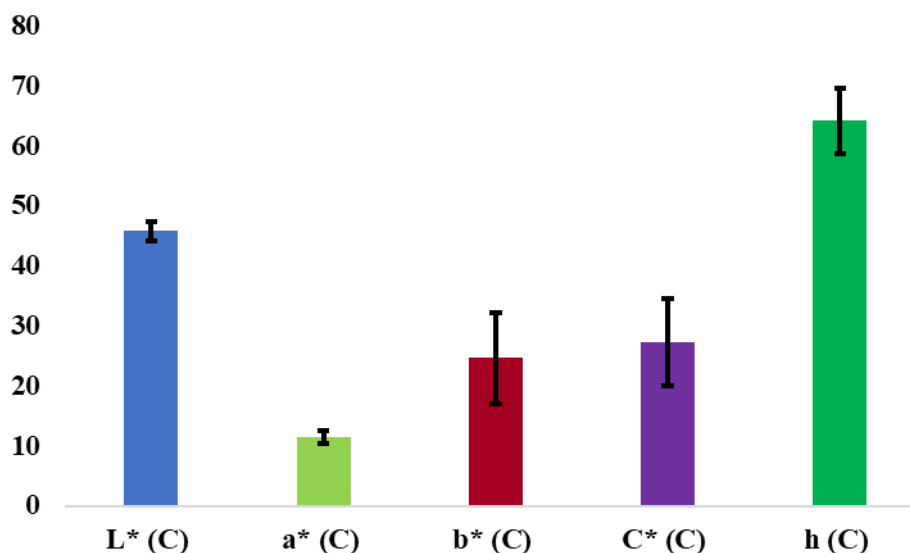


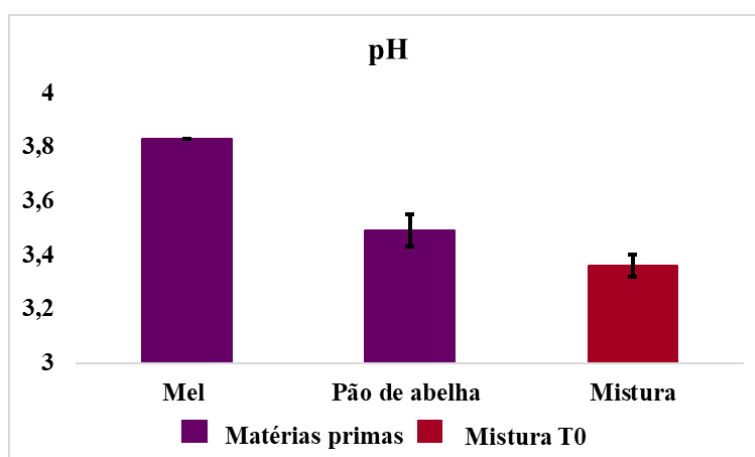
Figura 14: Avaliação da cor do pão de abelha utilizado na preparação da mistura com mel,

4.1.2.2. pH e acidez livre

O pH é um dos parâmetros utilizados para o controlo da qualidade de alguns produtos apícolas e está relacionado com a presença de ácidos orgânicos que podem resultar de processos de fermentação. Na **Figura 15**, podemos observar os valores do pH para as matérias-primas e para a mistura do pão de abelha com o mel. O mel apresentou um pH de 3,83 e o pão de abelha um valor de 3,49, enquanto que a mistura das duas matérias-primas registou um pH de 3,36, ou seja, todos na zona ácida da escala de pH, o que garante a estabilidade e evita o crescimento de microrganismos (Caveiro, 2017). É também de destacar que o seu pH é inferior ao do mel, o que poderá ser explicado pela presença de uma maior quantidade de ácido láctico, resultado dos processos de fermentação que se verificam durante a transformação do pólen em pão de abelha. De facto, de acordo com a literatura, o nível de ácido láctico presente no pão de abelha é aproximadamente seis vezes maior do que o registado no pólen, contribuindo para a inibição do crescimento de bolores e outros microrganismos e, conseqüentemente, para uma maior estabilidade (Tomás, 2013). A combinação de valores baixos de pH e a_w

aumenta a vida útil do pão de abelha, inibindo o crescimento microbiano e reduzindo problemas de textura e estabilidade (Smati, 2022).

Na **Figura 15**, podemos ainda encontrar os valores de acidez livre obtidos para o mel, pão de abelha e para a mistura de ambas as matérias-primas, tendo-se obtido os valores de 21,1 meqKg⁻¹, 108,8 meqKg⁻¹ e 100,3 meqKg⁻¹, respetivamente. No caso do mel, segundo o Decreto-Lei n° 214/2003 de 18 de setembro, o limite máximo para a acidez do mel é de 50 meqkg⁻¹, podendo-se concluir que o mel utilizado na preparação da mistura com o pão de abelha se encontra dentro destes limites. Valores de acidez superiores ao que consta no Decreto-Lei n° 214/2003 podem indicar a ocorrência de processos de fermentação indesejados, levados a cabo por microrganismos (Caveiro, 2017). A acidez é oriunda do néctar, por ação da glucose oxidase e também pela ação dos microrganismos na fase de maturação (Caveiro, 2017). No caso do pão de abelha, o maior valor de acidez é reflexo da fermentação do pólen durante o processo natural de produção do pão de abelha, contribuindo para a sua maior estabilidade. Deste modo, e como seria de esperar, a mistura preparada com o pão de abelha e o mel apresenta um valor de acidez significativamente superior ao do mel, embora um pouco inferior ao do pão de abelha, podendo, ainda assim, contribuir para uma adequada estabilidade do produto obtido.



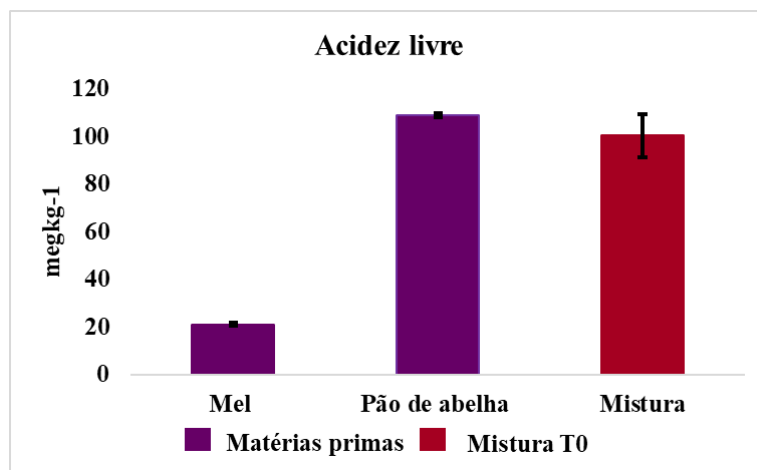


Figura 15: Avaliação do pH e da acidez livre nas matérias-primas e na mistura T0.

4.1.2.3. Teor de humidade e atividade da água (a_w)

O conteúdo em humidade é um parâmetro quantitativo que mostra a presença de água no alimento, sendo muito importante fazer a sua avaliação já que reflete diretamente a qualidade e estabilidade do alimento, visto que durante o armazenamento tem influência nas reações químicas ou enzimáticas (Vilares, 2020).

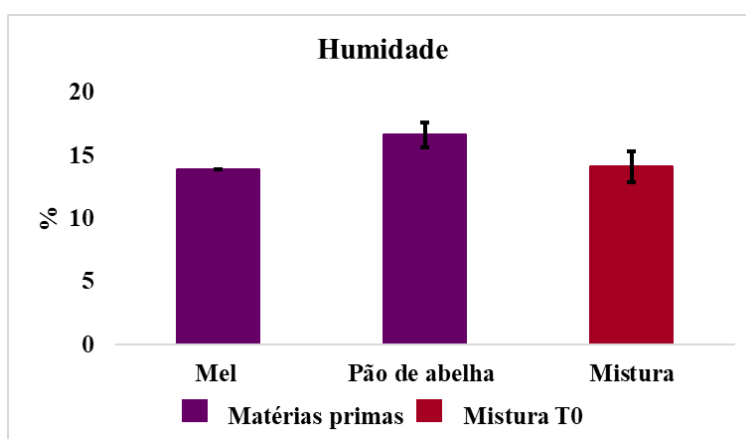
Ao observar a **Figura 16**, podemos verificar que obtivemos um teor de humidade de 13,9 % para o mel, 16,6 % para o pão de abelha e 14,1 % para a mistura do pão de abelha e mel.

De acordo com a Diretiva 2001/110/CE, de 20 de dezembro, transposta para a ordem jurídica nacional através do Decreto-Lei nº214/2003, de 18 de setembro, está estabelecido um valor máximo de 20 % para a humidade no mel. Deste modo, podemos concluir que o teor de humidade do mel utilizado na preparação da mistura do pão de abelha com o mel está dentro dos limites estabelecidos (Caveiro, 2017). De acordo com Bertoldi *et al.*, (2007), teores de humidade inferiores aos limites estabelecidos pela legislação levam a que o produto tenha um tempo de vida útil mais elevado, dado que as condições se tornam inadequadas para o desenvolvimento de microrganismos. Ao compararmos o nosso valor encontrado no mel de rosmaninho com os encontrados em um estudo feito por Lopes, (2013) cujo o tema é “Estudo do efeito da temperatura na qualidade do mel”, o nosso valor é mais baixo que o dela, já que o encontrado por ela foi de 16,4 %, a temperatura ambiente.

Para o pão de abelha, verificou-se que o mesmo apresentou um teor de humidade de 16,6 %, semelhante ao reportado num estudo realizado por Smati (2022), onde se

observaram valores compreendidos entre 16 e 17%. Num outro estudo feito com 17 amostras de pão de abelha dos concelhos de Bragança e Vinhais (Tomás, 2013), obtiveram-se valores entre 9 e 19%, verificando-se assim que o teor de humidade do pão de abelha usado neste trabalho se encontra dentro dessa gama. De acordo com Tomás (2013), se o pão de abelha tiver um teor de humidade elevado para a comercialização, deve-se fazer um processo prévio de secagem, de forma a reduzir o teor de humidade, contribuir para a sua conservação, já que é um produto sujeito à proliferação de contaminações microbiológicas que podem afetar a sua qualidade e comercialização.

A atividade da água é um parâmetro que permite prever o potencial de conservação de um determinado produto alimentar, sendo uma medida da água que se encontra disponível para participar em processos que podem levar à deterioração do alimento, afetando a sua qualidade (Tomás, 2013). Considerando a **Figura 16**, podemos observar que as matérias-primas e a mistura de pão de abelha com mel apresentaram uma atividade da água de 0,54. De uma forma geral, é considerado que, para valores de atividade da água inferiores a 0,60, não existem condições favoráveis para o crescimento de microrganismos, o que contribui para a estabilidade do produto alimentar. No caso particular do mel, de acordo com Melo (2016), estes valores de atividade da água são desfavoráveis para o desenvolvimento de fungos, como é o caso do *Penicillium* spp. e *Mucor* spp. O pão de abelha utilizado neste trabalho apresentou o mesmo valor para a atividade da água, ou seja 0,54. Este valor encontra-se dentro da gama de valores registados num estudo onde se reportaram valores de atividade da água compreendidos entre 0,50 e 0,60 (Smati, 2022).



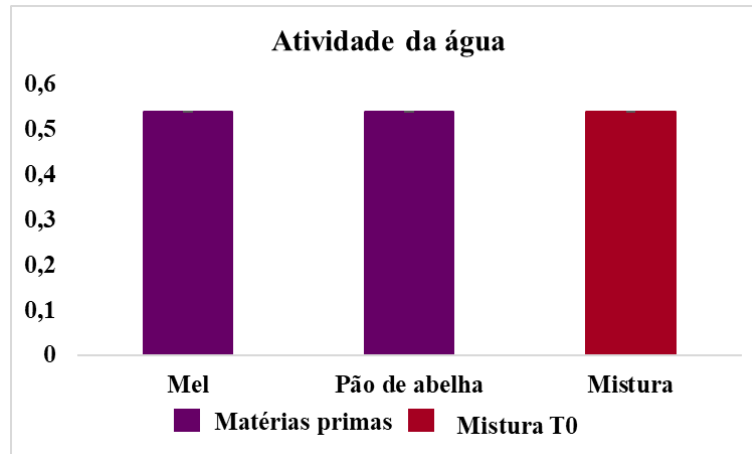


Figura 16: Percentagem do teor de humidade e atividade de água das matérias-primas e na mistura T0.

4.1.2.4. Teores de proteínas, gorduras e cinzas

Segundo (Caveiro, 2017), de uma forma geral, o conteúdo proteico encontrado no mel é resultado da presença de enzimas derivadas do néctar, pólen da planta e das secreções das glândulas salivares das abelhas . podendo ter alguma influência na definição do aroma do mel, através da participação nas reações de Maillard que poderão ocorrer.

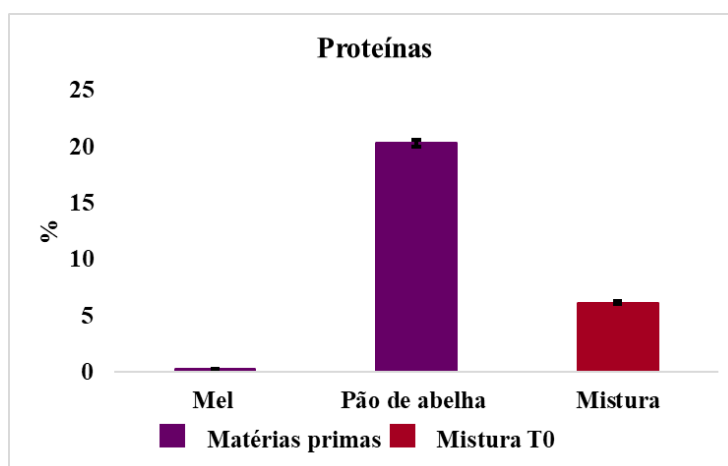
Observando a **Figura 17**, podemos verificar que o conteúdo proteico obtido foi 0,29% para o mel, 20,3% para o pão de abelha e 6,8% para a mistura de pão de abelha e mel. Estes valores estão em acordo com os verificados em alguns estudos, concretamente no caso do mel, onde se registaram valores de 0,5% (Lopes, 2013) e de 0,29 – 0,36% (Mouffok, 2021), e no caso do pão de abelha, onde o teor médio reportado foi de 18% (Tomás, 2013). No entanto, dado que a composição dos produtos apícolas depende bastante da respetiva origem floral, é também possível encontrar na literatura estudos onde se reportam teores de proteína distintos dos obtidos no presente estudo estudo. Como exemplo, podemos referir os teores de proteína registados por Smati (2022) no pão de abelha (25 – 30%). Esta variabilidade também se encontra evidenciada num estudo realizado por Vilares (2020), onde se registaram teores de proteína para o pão de abelha entre 14 e 37%.

Relativamente ao teor de gordura, as matérias-primas apresentaram valores de 0 %, para o mel, e 5,0 % para o pão de abelha (**Figura 17**). No caso da mistura do pão de abelha com o mel, o valor médio obtido foi de 1,9% (**Figura 17**). O valor obtido para o pão de abelha, está de acordo com alguma da literatura, onde se podem encontrar valores entre 4 % e 17 % (Tomás, 2013). No entanto, é ainda possível encontrar valores inferiores

ao por nós registados, como é o caso do teor de gordura do pão de abelha registado num estudo de Smati (2022): 2,5 – 3 %. Este facto é explicado pela variabilidade no teor de gordura do pólen, onde se podem encontrar ácidos gordos essenciais e compostos antioxidantes essenciais (Mărgăoan *et al.*, 2014; Smati, 2022).

A cinza alimentar é um resíduo inorgânico deixado após a combustão da matéria orgânica, que se transforma em CO₂, H₂O e NO₂. A cinza resultante nem sempre apresenta a mesma composição em substâncias minerais originalmente presentes nos alimentos, como reflexo das perdas que podem ocorrer, devido à evaporação ou interação dos componentes da amostra (Martins, 2018; Vilares, 2020). No presente trabalho, o conteúdo de cinzas encontrado para as matérias-primas foi de 0,09%, para o mel, e 2,4%, para o pão de abelha (**Figura 17**), enquanto que para a mistura de pão de abelha e mel se registou um valor de 0,7% (**Figura 17**). No caso do mel, os teores de cinza obtidos neste trabalho são inferiores aos valores de 0,22% observados num estudo realizado por Lopes (2013). Este resultado pode ser explicado visto que, tal como acontece com os compostos anteriormente referidos, o teor de cinzas também pode ser afetado pelas condições geográficas, pelas propriedades do solo, a origem e pelos processos de apanha e limpeza. De qualquer dos modos, o valor do teor de cinza obtido está em conformidade com o valor estipulado na Norma Portuguesa 1307/83 (2ª edição), onde se estabelece que o teor de cinzas não deve exceder 0,6%, para o mel de néctar, e 1% para o mel de melada (Caveiro, 2017). Deste modo, podemos concluir que o mel usado para a preparação das misturas com o pão de abelha está em conformidade com o valor estabelecido na norma portuguesa.

Relativamente ao pão de abelha, o valor obtido no nosso trabalho é similar ao obtido por Smati (2022), onde é reportado um teor de cinza entre 2,5-3%.



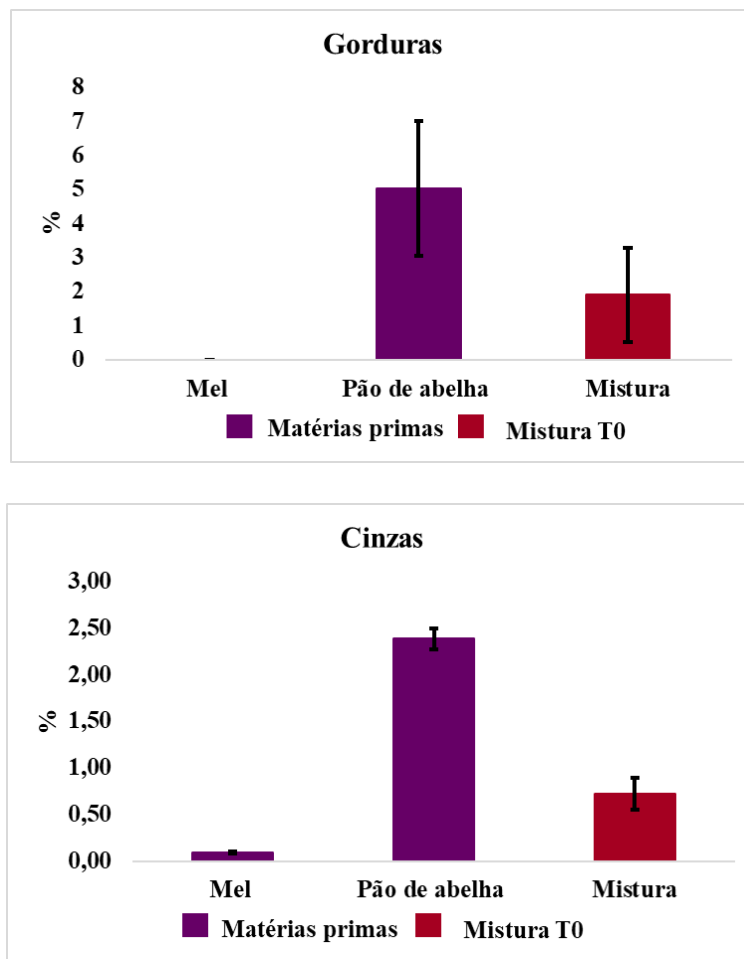


Figura 17: Percentagem de proteínas, gorduras e cinzas das matérias-primas e na mistura T0.

4.1.2.5. Teor de hidratos de carbono e açúcares

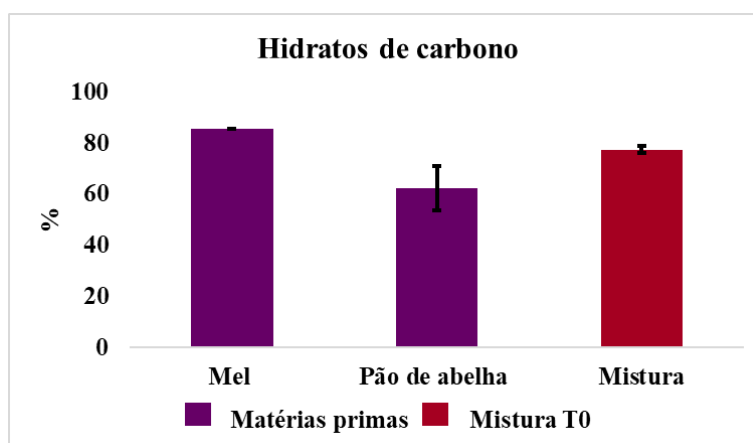
O mel é uma solução açucarada altamente concentrada cujos principais componentes são monossacarídeos frutose e glucose (Mouffok, 2021). A alta concentração de diferentes açúcares define algumas características físicas e químicas do mel, como por exemplo, a viscosidade, a densidade, a higroscopicidade e a capacidade de granulação (cristalização) (Lopes, 2014). Essas características são influenciadas pela origem geográfica e botânica do mel, pelas condições climáticas, processamento e armazenamento (Lopes, 2014).

Em relação aos hidratos de carbono (**Figura 18**), calculados por diferença, obtivemos um teor de 85,7%, para o mel, e de 55,7%, para o pão de abelha. Para a mistura do pão de abelha com mel, obteve-se um teor de carboidratos de 77,06%. Num estudo realizado por Mouffok (2021), os valores obtidos para o teor de hidratos de carbono do

mel foram entre 83,0 a 86,6 g/100g, ou seja, semelhantes aos obtidos neste estudo. De forma semelhante, o teor de hidratos de carbono obtido no presente trabalho, foi semelhante ao observado num estudo de Tomás *et al.*, (2017), onde obtiveram um valor de aproximadamente 58 %.

Na **Figura 18** podemos observar o conteúdo em açúcares das matérias-primas e da mistura do pão de abelha com o mel. A frutose e glucose foram os monossacarídeos maioritários encontrados nas matérias-primas e na mistura das mesmas, com cerca de 34,86 g/100g e 26,79 g/100g para o mel, 12,23 g/100g e 4,09 g/100g para o pão de abelha e 28,58 g/100g e 19,99 g/100g para a mistura, respetivamente. De acordo com o Decreto n.º 214/2003, de 18 de setembro, para que o mel seja considerado mel de néctar é necessário que o teor total de frutose e glicose seja superior ou igual a 60 g/100g, o que se verificou para o mel utilizado durante o presente trabalho.

Tal como sucede para o mel, o teor de açúcar do pão de abelha também varia de acordo com a sua origem botânica e geográfica, bem como a época de recolha, apresentando uma composição muito idêntica à do mel, com a presença dos monossacarídeos frutose e glucose como maioritários (Tomás, 2013). Estes açúcares são utilizados pelas bactérias do ácido láctico durante o processo de fermentação do pólen, transformando-o em etanol, ácido láctico e dióxido de carbono (Mohammad *et al.*, 2020). Num estudo realizado por Tomás *et al.*, (2017), utilizando 17 amostras de pão de abelha com origem no Nordeste Transmontano, foram registados valores de frutose entre 9,4 g/100g e 26,4 g/100g e da glucose entre 6,7 g/100g a 17,3 g/100g, que são valores semelhantes aos obtidos no presente estudo, onde também se usou pão de abelha com a mesma origem geográfica.



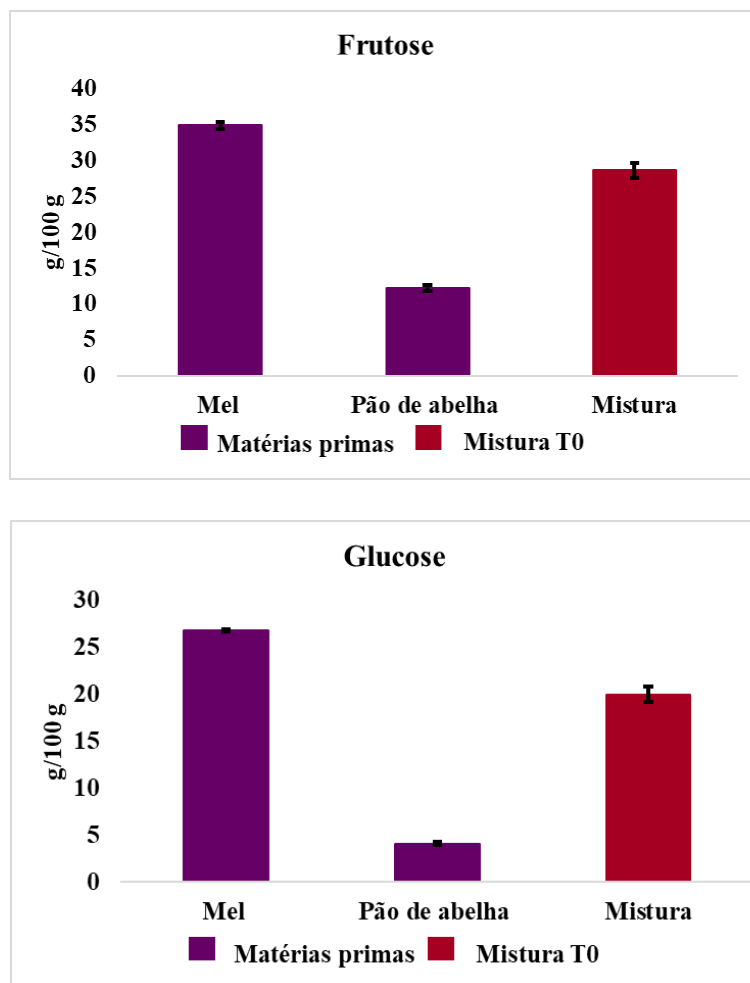


Figura 18: Avaliação dos hidratos de carbono e dos açúcares nas matérias-primas e na mistura T0.

4.1.2.6. Teor de compostos fenólicos, teor de flavonóides e avaliação da atividade antioxidante

Os compostos fenólicos são resultado do metabolismo secundário das plantas, sendo frequentemente reportados devido às suas propriedades biológicas, como é o caso da atividade antioxidante, propriedades anti-histamínicas, anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais (Tomás, 2013; Melo, 2016). Dentro deste vasto grupo de compostos, podemos encontrar ácidos fenólicos simples e flavonóides, como é o caso de flavonas, flavonóis, flavanonas e diidroflavonóis. Para o caso da atividade antioxidante, a sua presença e intensidade depende muito do número de grupos hidroxilo presentes na molécula (Tomás, 2013). No caso particular do pão de abelha, a análise dos compostos flavonóides tem sido utilizada como uma ferramenta para determinar a sua origem floral, auxiliando na deteção de fraudes relacionadas com a origem polínica (Tomás, 2013).

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado espectrofotometricamente, com recurso ao método de Folin-Ciocalteu, encontrando-se os resultados ilustrados na **Figura 19**, e podendo-se observar que o mel apresenta um teor de 1,1 mg GAE/g, o pão de abelha 18,3 mg GAE/g e a mistura do pão de abelha com o mel 4,7 mg GAE /g. Relativamente ao mel, os resultados registados neste trabalho são superiores aos obtidos por Mouffok, (2021), que reporta valores de compostos fenólicos totais entre 0,30 e 0,61 mg GAE/g, evidenciando, mais uma vez, a elevada dependência das características destes produtos apícolas relativamente a questões relacionadas com origem botânica, clima, e processamento, por exemplo. Já para o pão de abelha, num estudo de Tomás *et al.* (2017), são reportados teores de compostos fenólicos totais entre 14 e 84 mg GAE/g, que estão em concordância com os obtidos no presente trabalho. É possível verificar que o teor de compostos fenólicos totais é maior no pão de abelha do que no mel. Este facto, poderá estar relacionado com a destruição da estrutura do pólen durante a sua fermentação, no processo natural de produção do pão de abelha, o que levará a uma maior facilidade na extração e quantificação dos compostos fenólicos.

Relativamente ao teor de flavonóides (**Figura 19**), as matérias-primas apresentaram um valor de 0,05 mg QE/g para o mel e 4,50 mg QE/g para o pão de abelha. Para a mistura destas matérias-primas, registou-se um valor de 1,00mg QE/g. Os valores obtidos no presente estudo são semelhantes aos reportados para o caso do mel, num estudo de Mouffok (2021) (0,02 – 0,10 mg QE/g), bem como para o pão de abelha (0,2 – 4,2 mg QE/g), no estudo realizado por Tomás (2013).

A atividade antioxidante das matérias-primas, bem como da mistura das mesmas, foi avaliada através da capacidade bloqueadora de radicais DPPH, expressa em termos de percentagem de inibição, estando os resultados ilustrados na **Figura 19**. É possível verificar que, no caso das matérias-primas, foram registados valores de 5,0% para o mel e 44,7% para o pão de abelha, enquanto que para a mistura se obteve uma percentagem de inibição de 46,9%. Este resultado mostra que a mistura tem uma atividade antioxidante superior à do mel e semelhante à apresentada pelo pão de abelha, apesar dos menores teores de compostos fenólicos totais e de flavonóides apresentados pela mistura. Este facto, poderá resultar em efeitos benéficos (diminuição do risco associado a doenças degenerativas, diminuição do estresse oxidativo e inibição da oxidação de macromoléculas (Tomás *et al.*, 2017) associados à ingestão da mistura de pão de abelha e mel semelhantes aos que poderiam ser obtidos com a ingestão do pão de abelha, mas

através de um produto com características sensoriais, nomeadamente ao nível do sabor, mais apreciadas pelo consumidor.

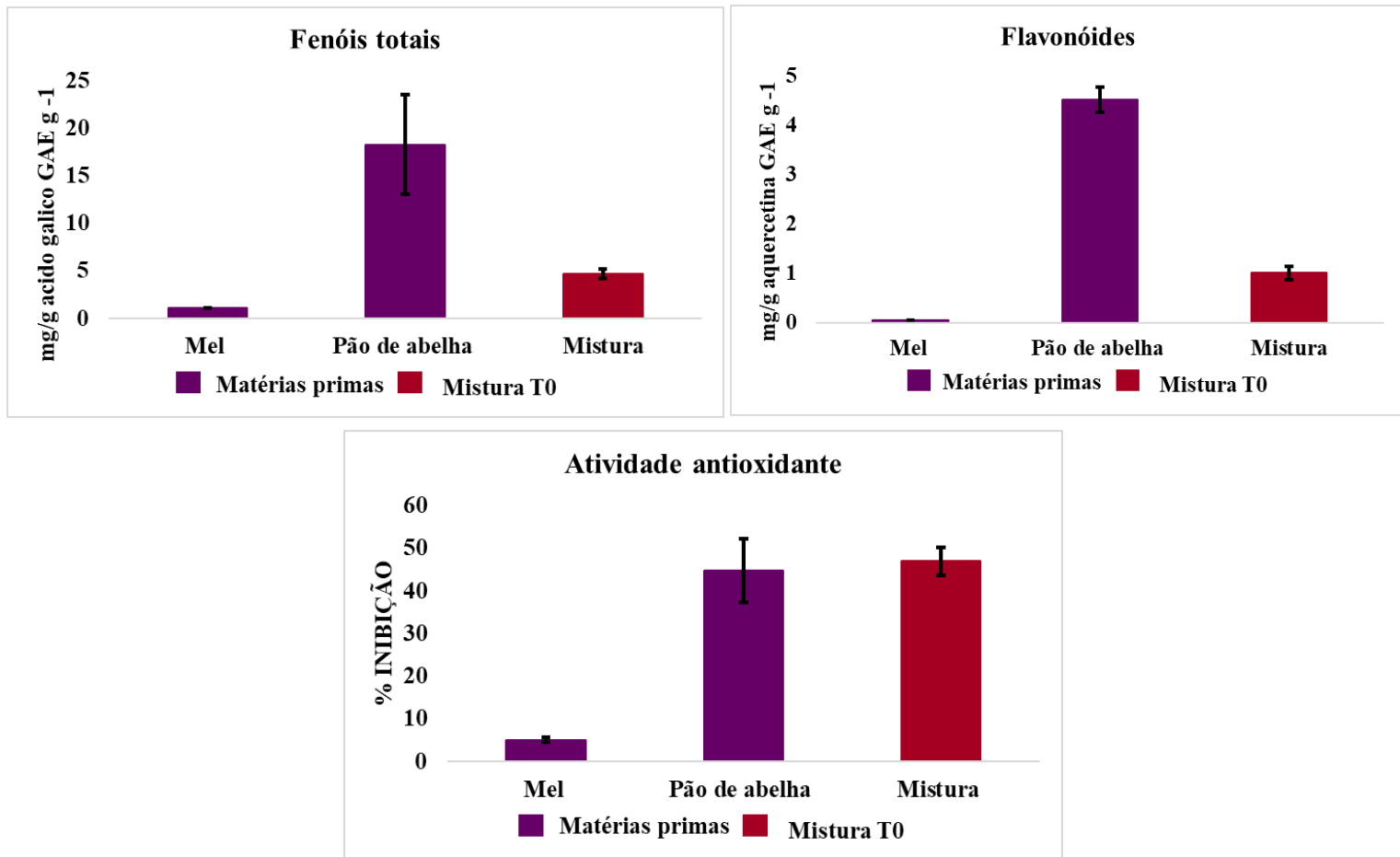


Figura 19: Teor de fenóis totais, flavonóides e atividade antioxidante nas matérias-primas e na mistura T0.

4.1.3. Caraterização microbiológica

Nesta secção serão analisados e discutidos os resultados obtidos na caraterização microbiológica das matérias-primas e da mistura. A caraterização microbiológica foi realizada em todas as amostras (mel, pão de abelha e mistura imediatamente após preparação, T0) com o objetivo de avaliar a carga de microrganismos indicadores de qualidade comercial (mesófilos aeróbios, bolores e leveduras e bactérias do ácido láctico), de qualidade higio-sanitária (coliformes totais e *E. coli*, *S. aureus*), e de segurança (esporos de clostrídios sulfito-redutores). Apesar de não ser objetivo do trabalho avaliar a qualidade microbiológica das matérias-primas e da mistura, é da maior importância conhecer a sua carga microbiológica para se poder compreender e acompanhar a estabilidade da mistura durante o armazenamento.

4.1.3.1. Mesófilos aeróbios

Os mesófilos aeróbios são um dos mais importantes parâmetros indicadores de qualidade comercial dos produtos alimentares. Quando em níveis elevados, podem apontar contaminação na matéria-prima, inadequada limpeza e desinfecção das superfícies, pouca higienização nas áreas de produção ou armazenamento, controlo do tempo/temperatura inadequado nas áreas de produção ou armazenamento, o que coloca em risco o tempo de vida útil do produto alimentar e pode afetar a eficácia das condições de armazenamento (de Arruda *et al.*, 2017; Smati, 2022).

Ao observar a **Figura 20**, pode-se verificar que os mesófilos aeróbios foram detetados em níveis baixos tanto nas matérias-primas como na mistura. O mel obteve o valor de 1,31 log₁₀ UFC/g, para o pão de abelha foi de 2,72 log₁₀ UFC/g, enquanto para a mistura foi de 2,49 log₁₀ UFC/g.

De acordo com o guia de Interpretação dos resultados de ensaios microbiológicos em alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, 2019), o mel poderá ser enquadrado no grupo 1 do subgrupo 1B e o pão de abelha e a mistura no grupo 4 (INSA, 2019). Pode-se constatar que estes valores tanto para as matérias-primas como para a mistura encontram-se dentro dos limites propostos pelo INSA, o que quer dizer que ele está apto para o consumo humano.

Os resultados obtidos são semelhantes aos reportados em estudos anteriores para o mel (2,30 log₁₀ CFU/g; Lopes, 2013) e para o pão de abelha (2,00 log₁₀ UFC/g; Smati, 2022) que se encontram dentro dos limites estabelecidos.

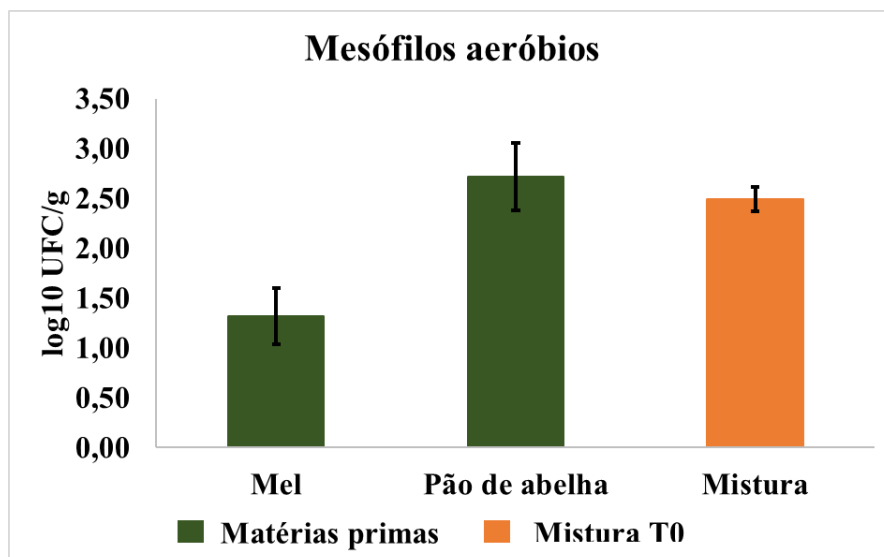


Figura 20: Avaliação dos mesófilos aeróbios nas matérias-primas e na mistura T0.

4.1.3.2. Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras presentes num produto alimentar são geralmente indicadores das condições de higiene na manipulação dos apiários (conjunto de colmeias) (de Arruda *et al.*, 2017).

Em termos dos resultados dos bolores pode-se observar na **Figura 21a** que foram detetados em níveis baixos tanto no pão de abelha (2,9 log₁₀ UFC/g) como na mistura (2,4 log₁₀ UFC/g), não tendo sido detetados no mel.

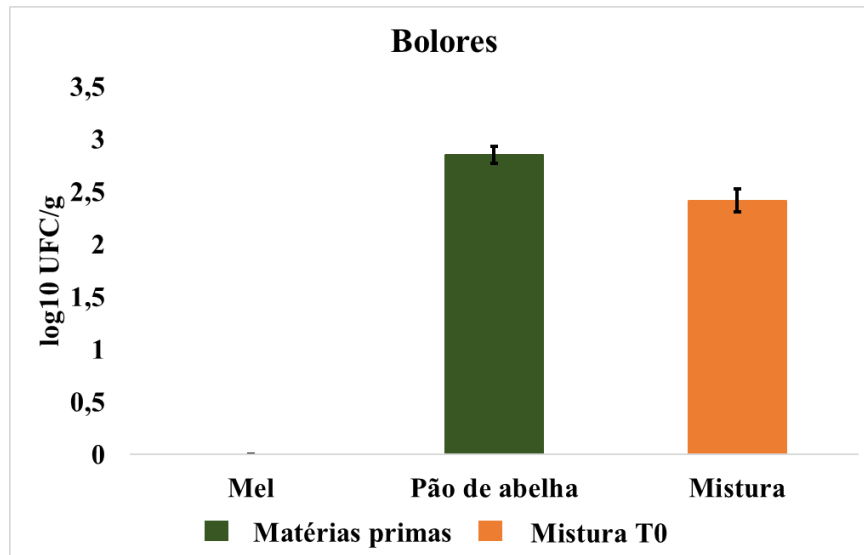
Em relação às leveduras (**Figura 21b**), estas apenas foram detetadas na mistura (2,2 log₁₀ UFC/g) e em níveis muito baixos. O facto de serem detetadas leveduras na mistura, mas não nas suas matérias-primas pode resultar de os valores observados serem muito próximos do limite de deteção (1,7 log₁₀ UFC/g).

Relativamente aos níveis de bolores presentes nos diferentes alimentos, temos que os grupos 1, 2 e 3 devem ter um valor inferior a 2,7 log₁₀ UFC/g para serem considerados satisfatórios, enquanto valores entre 2,7 e ≤ 3,0 log₁₀ UFC/g são considerados questionáveis e valores superiores a 3,0 log₁₀ UFC/g já são considerados não satisfatórios (INSA, 2019), por isso é necessário adotar medidas para reduzir esses microrganismos a níveis aceitáveis ou até mesmo eliminá-los. Para as leveduras o subgrupo 1B os limites estabelecidos para satisfatório é de < 3,0, para o questionável é de 3,0 e ≤ 4,0 e para os não satisfatórios o valor é inferior a 10⁴. Para as leveduras do grupo 4 os limites não são aplicáveis (INSA, 2019).

É importante ressaltar que os resultados considerados adequados para bolores são mais baixos do que os valores aceitáveis para as leveduras. Isso ocorre porque os bolores têm a capacidade de causar danos à saúde, devido às toxinas fúngicas produzidas por esses microrganismos (Maia, 2022).

Estes resultados indicam que o mel terá sido manuseado de forma adequada ao ser retirado da colmeia e no seu armazenamento. No que se refere ao pão de abelha, os valores obtidos para leveduras são considerados satisfatórios (INSA, 2019). A presença de bolores, ainda que em valores considerados aceitáveis, deve ser devidamente controlada ao longo do armazenamento, devido à possibilidade de existência de bolores toxigênicos.

Comparando os nossos resultados do pão de abelha com os resultados encontrados no estudo feito por Smati, (2022), mostraram tendências quase semelhantes nos bolores, em que o valor encontrado por eles quase idêntico ao nosso ($3,00 \log_{10}$ UFC/g). Em relação as leveduras foram muito diferentes, em que o valor encontrado foi muito mais alto do que o presente estudo ($3,50 \log_{10}$ UFC/g).



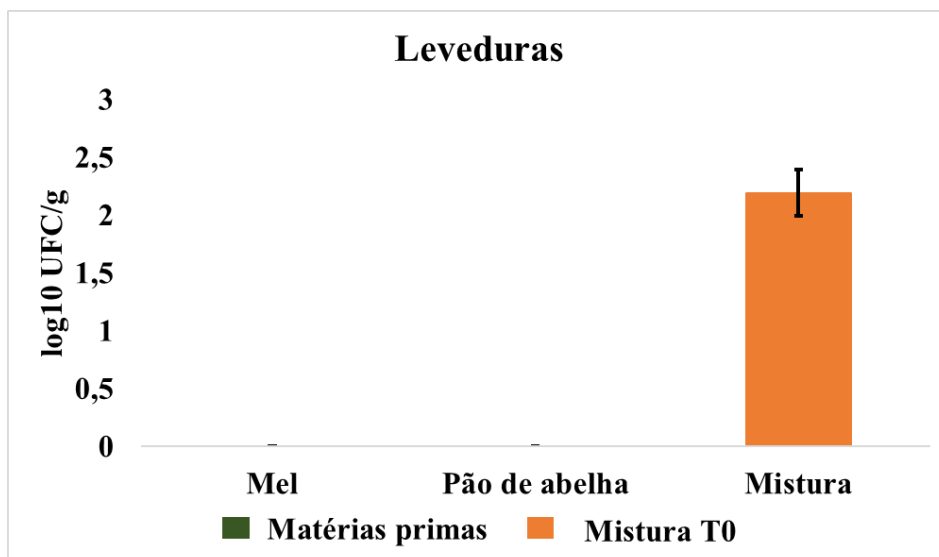


Figura 21: Avaliação dos bolores e leveduras nas matérias-primas e na mistura T0.

4.1.3.3. Coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Os coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* são indicadores da qualidade higiênic-sanitária dos alimentos (Lopes, 2013).

Relativamente aos níveis de *E. coli* presentes nos alimentos, temos que os grupos 1, 2 e 3 devem ter um valor inferior a 0 log₁₀ UFC/g para serem considerados satisfatórios, para serem considerados questionáveis o grupo 1 não tem limite aplicado e para o grupo 2 e 3 devem ter valores entre 0 e ≤ 2,0 log₁₀ UFC/g e para serem considerados não satisfatórios o grupo 1 deve ter valores superiores a 0 log₁₀ UFC/g e para o grupo 2 e 3 devem ter valores superiores a 2,0 log₁₀ UFC/g (INSA, 2019).

Os coliformes totais e *E. coli* não foram detetados tanto nas matérias-primas (mel e pão de abelha) como na mistura T0, estando dentro dos limites estabelecidos. Por outro lado, podemos constatar que *S. aureus* foram encontrados em níveis baixos nas matérias-primas (mel 1,60 log₁₀ UFC/g; pão de abelha 1,48 log₁₀ UFC/g), não tendo sido detetados na mistura (**Figura 22**). O INSA (2019) não apresenta ou não estabelece limites para os coliformes totais e para os *S. aureus*. No entanto, esses resultados mostram uma manipulação adequada dos produtos, sugerindo Boas Práticas de Higiene.

Comparando os nossos resultados do pão de abelha com os resultados encontrados por Smati (2022) sobre os coliformes, mostraram tendências diferentes, em que o valor encontrado foi mais alto do que o nosso (3,40 log₁₀ UFC/g).

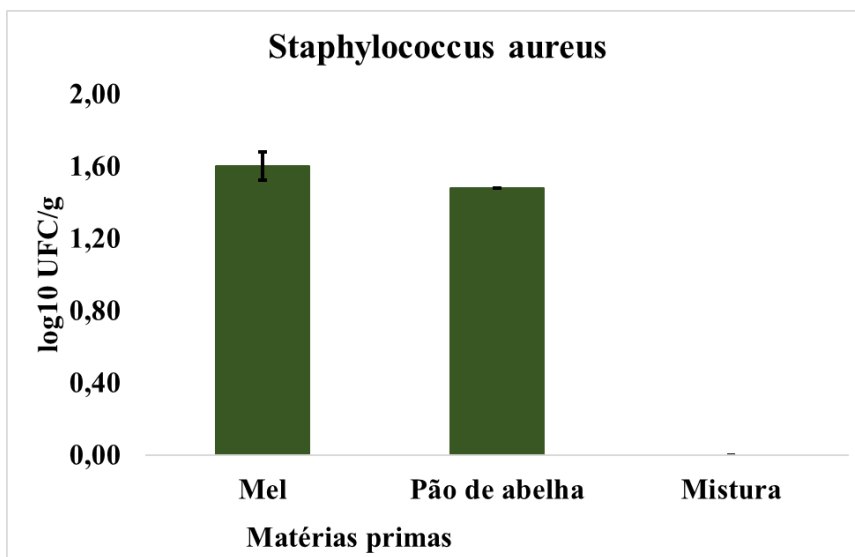


Figura 22: Avaliação de *Staphylococcus aureus* nas matérias-primas e na mistura T0.

4.1.3.4. Esporos de clostrídios sulfito-redutores

Os esporos de clostrídios sulfito-redutores são indicadores de segurança alimentar ou de higiene geral (Lopes, 2013).

Para a contagem nas amostras analisadas estes microrganismos foram encontrados em níveis baixos no pão de abelha (0,82 log₁₀ UFC/g) e na mistura T0 (0,82 log₁₀ UFC/g) (**Figura 23**). No mel estes microrganismos não foram detetados nas amostras analisadas.

A INSA (2019) não apresenta ou não estabelece limites para os esporos de clostrídios sulfito-redutores.

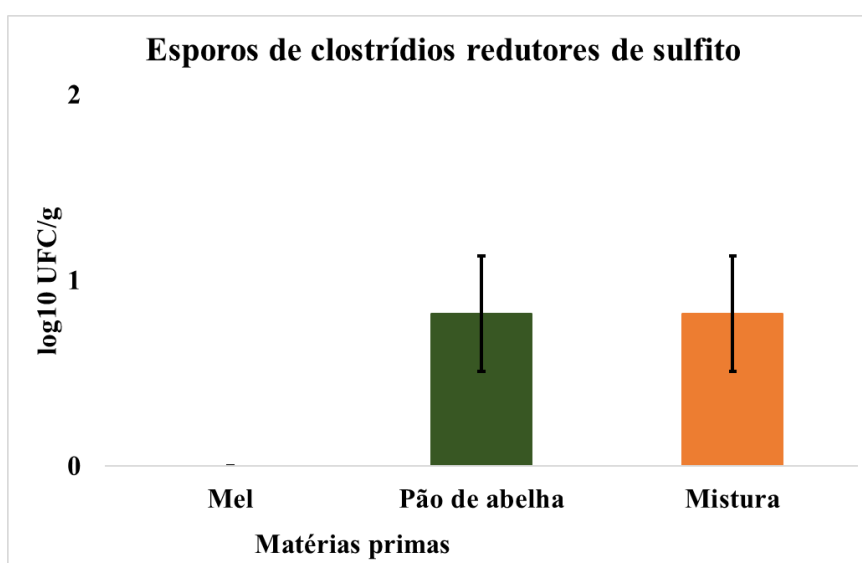


Figura 23: Avaliação dos esporos de clostrídios sulfito-redutores nas matérias-primas e na mistura T0.

4.1.3.5. Bactérias do ácido lático

Dado o pão de abelha ser um produto apícola que resulta da fermentação láctica do pólen apícola, é importante para o nosso estudo realizar a análise das bactérias do ácido lático (LAB).

Considerando a **Figura 24**, podemos constatar que os resultados obtidos foram detetados em níveis baixos nas matérias-primas (mel 1,50 \log_{10} UFC/g; pão de abelha 1,30 \log_{10} UFC/g). Para a mistura T0 não foram detetadas bactérias do ácido lático no produto.

A INSA (2019) não apresenta ou estabelece limites para as bactérias do ácido lático.

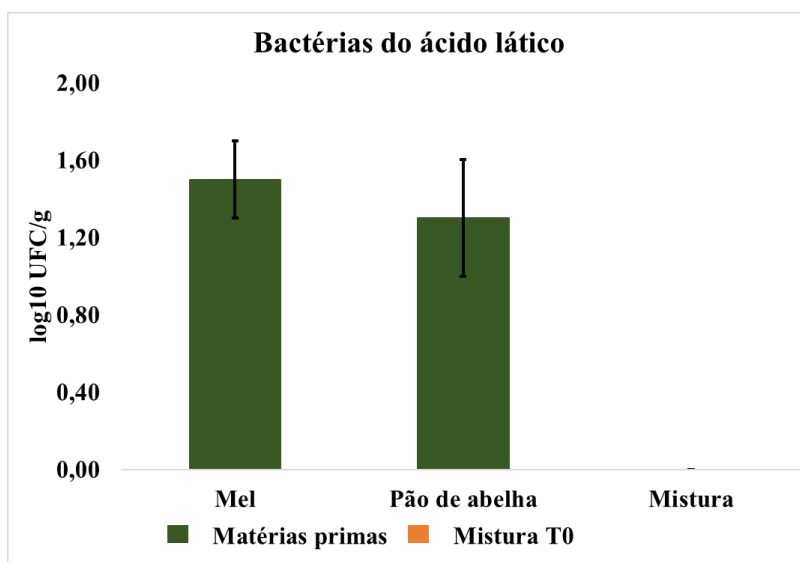


Figura 24: Avaliação das bactérias do ácido lático nas matérias-primas e na mistura T0.



Capítulo 5

4.2. Avaliação da estabilidade da mistura durante o armazenamento

4.3. Estabilidade físico-química

4.4. Estabilidade microbiológica

4.2. Avaliação da estabilidade da mistura durante o armazenamento

Após a caracterização físico-química e microbiológica da mistura do pão de abelha com o mel, foi realizada a avaliação da sua estabilidade durante um período de armazenamento de 6 meses, à temperatura ambiente. Durante este período, foram avaliadas características físico-químicas, como é o caso da cor, pH, acidez livre, atividade da água, humidade, teores de cinza, proteína, gordura e açúcares, para além do teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides e avaliação da atividade antioxidante, apresentados na seção 5.1. Relativamente à estabilidade microbiológica, foram avaliados parâmetros como mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus* e bactérias do ácido láctico, que se encontram apresentados na seção 5.2.

4.3. Estabilidade físico-química

4.3.1. Cor

A estabilidade no que se refere às características sensoriais é bastante importante, visto que são essas alterações que o consumidor mais facilmente consegue detetar, associando-as, na maioria das ocasiões, a uma perda de qualidade do produto. Na **Figura 25**, apresentam-se os valores para os parâmetros da cor que foram avaliados através do sistema de coordenadas CieLAB.

Com exceção da coordenada a^* , para todas as restantes foram registadas diferenças significativas ($p < 0,05$) durante o armazenamento. Para a luminosidade e ângulo de tonalidade, relacionadas, respetivamente, com as coordenadas L^* e h , verificou-se uma diferença significativa nos seus valores entre os 3 (Mistura T3) e os 6 meses (Mistura T6) de armazenamento. No caso das coordenadas b^* e C^* , registaram-se diferenças entre a mistura recém-preparada (Mistura T0), as misturas armazenadas durante 1 mês (Mistura T1) e as misturas armazenadas durante 6 meses (Mistura T6). Apesar das diferenças registadas ao longo do armazenamento, convém salientar que estas não foram perceptíveis através da inspeção visual das misturas ao longo do tempo. De qualquer das formas, não será de excluir a possibilidade da existência de algumas reações com impacto na coloração do produto, nomeadamente as reações de acastanhamento não

enzimático, também conhecidas como reações de Maillard, que ocorrem entre resíduos de aminoácidos e açúcares redutores.

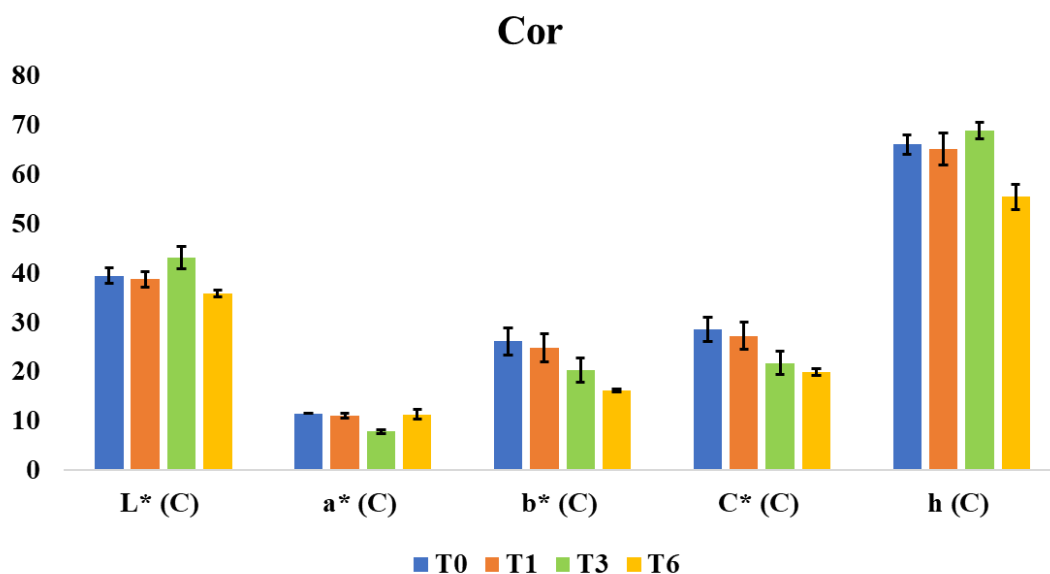


Figura 25: Avaliação da cor da mistura ao longo do tempo de armazenamento.

4.3.2. pH e acidez livre

Relativamente ao valor do pH da mistura de pão de abelha com mel, foi possível observar que os valores variaram entre 3,4 e 3,7, durante os 6 meses de armazenamento. No entanto, apesar de se terem registado diferenças estatisticamente significativas entre os valores para o pH da amostra no início do seu armazenamento, após 3 e 6 meses de armazenamento, a extensão das mesmas não deverá afetar a estabilidade do produto obtido.

A avaliação da acidez livre da mistura do pão de abelha com mel, apresentada na **Figura 26**, mostra que o parâmetro em questão apresentou valores que variaram entre 100,35 e 132,01 meq/kg, ao longo dos 6 meses de armazenamento, mas que, no entanto, essas diferenças não são significativas do ponto de vista estatístico. Este resultado, em conjunto, com a avaliação anteriormente feita relativamente ao pH, permite reforçar a hipótese de que a mistura permanece estável durante os 6 meses de armazenamento.

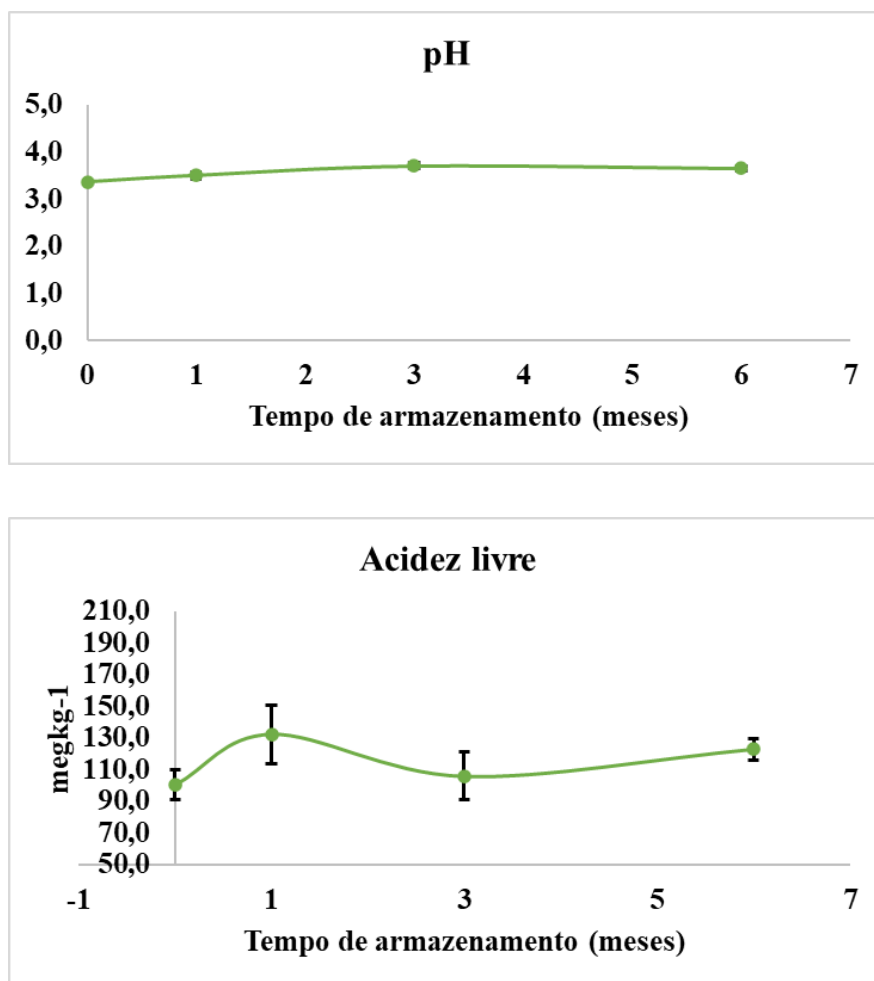


Figura 26: Avaliação do pH e da acidez livre na mistura ao longo tempo de armazenamento.

4.3.3. Teor de humidade e atividade da água (a_w)

Para além dos parâmetros anteriormente referidos, a humidade e a atividade da água são também aspetos importantes no que se relaciona com a estabilidade da mistura do pão de abelha com o mel. Como se pode observar na **Figura 27**, regista-se uma ligeira tendência para a redução do teor de humidade da mistura ao longo do armazenamento, mas que do ponto de vista estatístico não se revelou ser significativa. No que se refere à atividade da água, verificou-se uma ligeira tendência para o aumento do seu valor, tendo variado entre 0,53, para a mistura recém preparada, e 0,57, ao fim de 6 meses de armazenamento. Apesar de estatisticamente significativa, a extensão da variação é relativamente reduzida, o que, em conjunto com o facto de estarmos a falar de valores inferiores a 0,60, nos dá boas garantias em termos da estabilidade e segurança alimentar do produto resultante da mistura do pão de abelha com o mel.

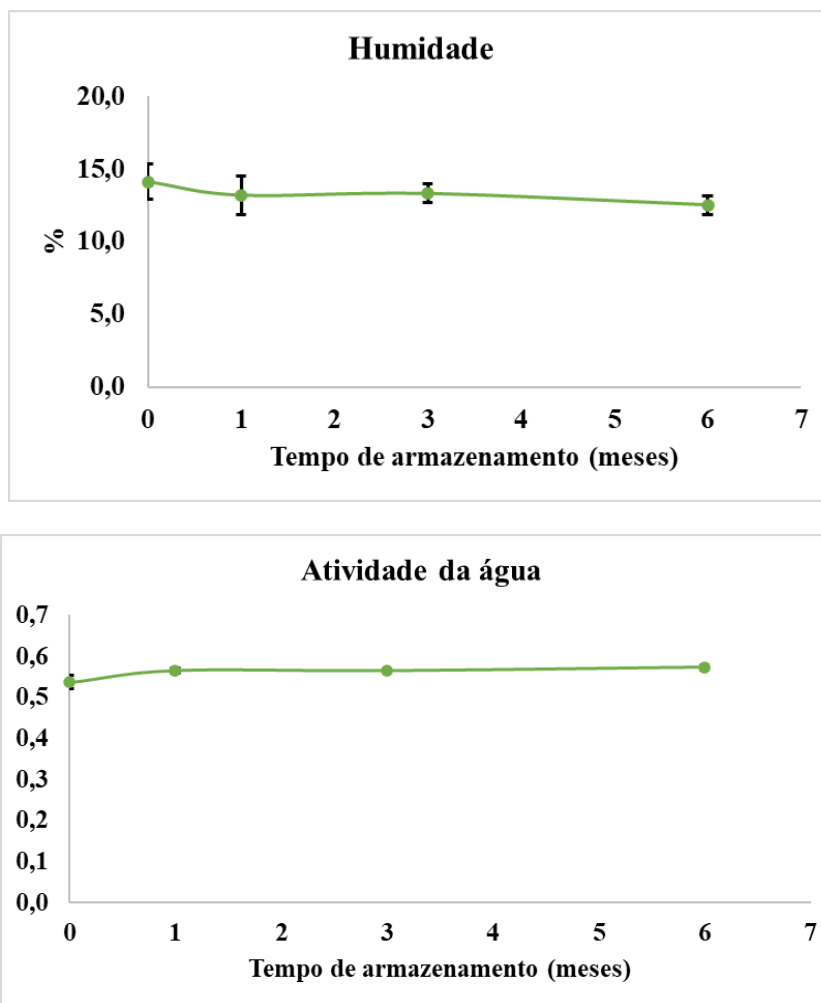


Figura 27: Percentagem do teor de humidade e da atividade da água na mistura ao longo tempo de armazenamento.

4.3.4. Teores de cinzas, proteínas e gorduras

Os resultados relativos à avaliação dos teores de cinza, proteína, gordura da mistura do pão de abelha com o mel, durante os 6 meses de armazenamento são apresentados na **Figura 28**. No que se refere a estes parâmetros, que se encontram diretamente relacionados com o valor nutricional da mistura do pão de abelha com o mel, verificaram-se variações para o teor de cinza, proteína, gordura entre 0,72 e 0,77 %, 6,01 e 6,40%, 1,89 e 2,78 %, respetivamente. Para todos os parâmetros avaliados, embora se registem algumas ligeiras variações, nenhuma se revelou ser estatisticamente significativa, o que sugere uma estabilidade para a mistura obtida, também do ponto de vista nutricional.

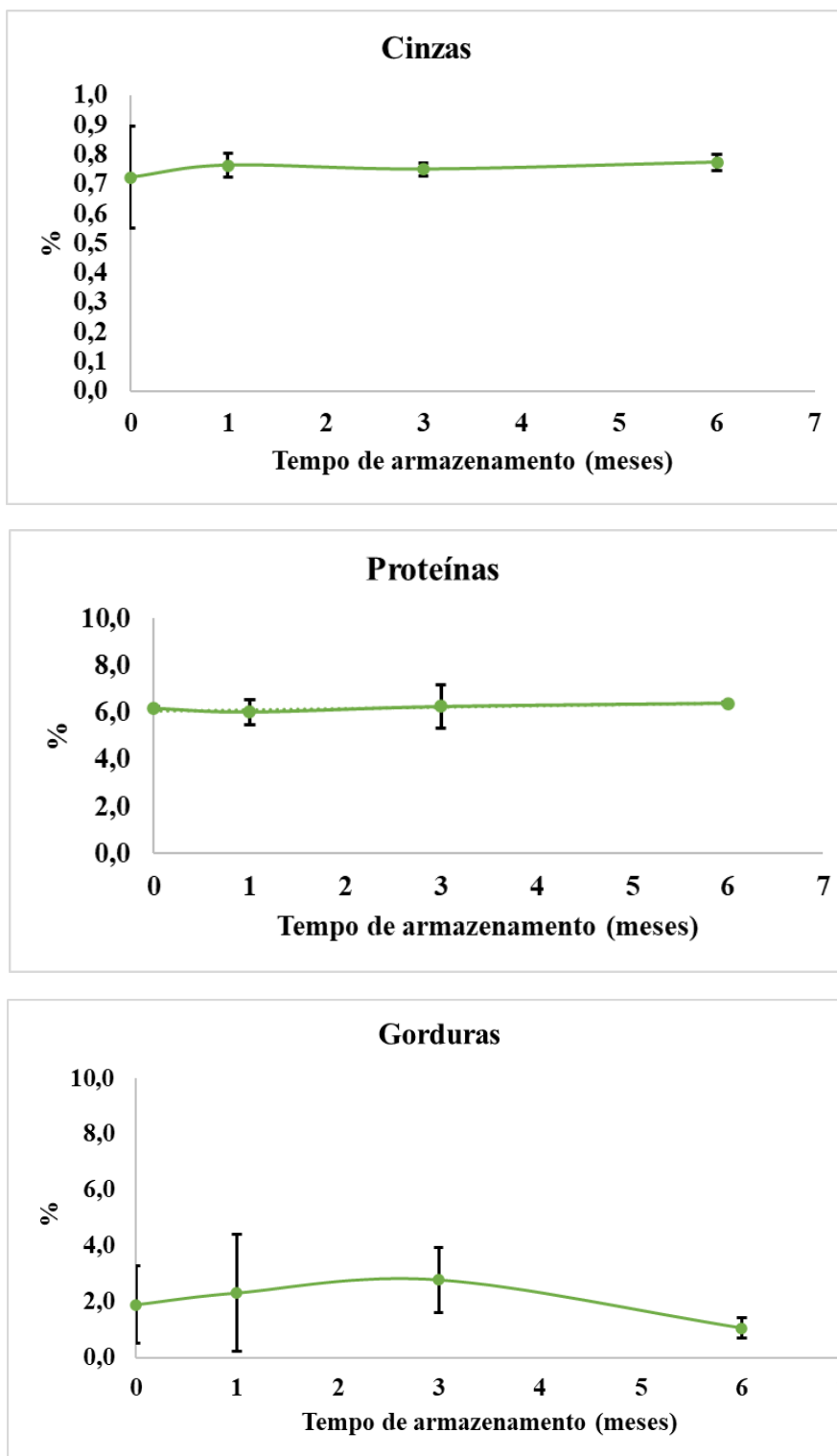
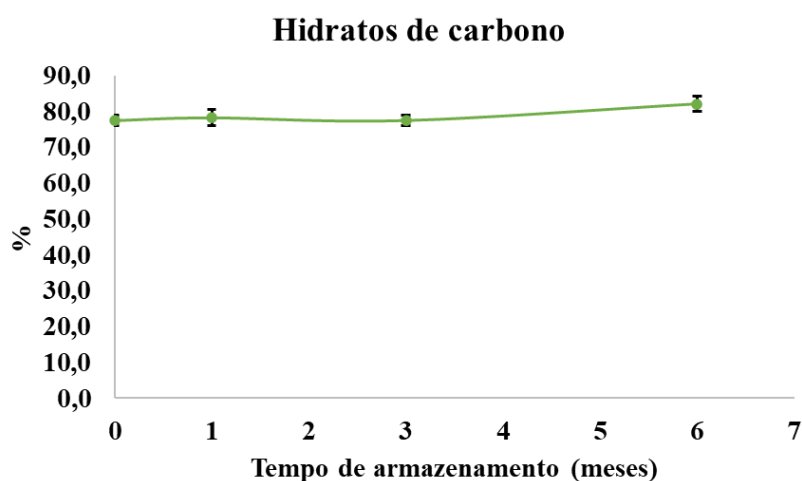


Figura 28: Percentagem de cinzas, proteínas e gorduras, na mistura ao longo tempo de armazenamento.

4.3.5. Teor de hidratos de carbono e açúcares

No que diz respeito aos hidratos de carbono, verificaram-se variações entre 77,52 e 82,03 %, embora se tenha registo ligeiras variações, não se revelou ser estatisticamente significativa, o que sugere uma estabilidade para a mistura obtida.

Tal como sucedeu para a caracterização da mistura do pão de abelha com o mel, a avaliação dos açúcares presentes ao longo do período de 6 meses de armazenamento, foi realizada através da técnica de HPLC, tendo-se detetado apenas a presença de glucose e frutose. Na **Figura 29**, é possível verificar a variação dos dois monossacarídeos durante o armazenamento. Para a frutose, os resultados obtidos variaram entre 25,79 e 29,91 g/100g, enquanto para a glucose os resultados registados estão compreendidos entre 17,36 e 21,23 g/100g, ao longo dos 6 meses de armazenamento. Mais uma vez, as variações registadas são relativamente reduzidas e, do ponto de vista estatístico, não são significativas. Desta forma, o resultado está em consonância, e vem reforçar, o que tinha sido previamente registado no caso dos hidratos de carbono, onde se incluem os açúcares, permitindo concluir que, do ponto de vista nutricional, estamos na presença de um produto que apresenta estabilidade durante o tempo de armazenamento avaliado.



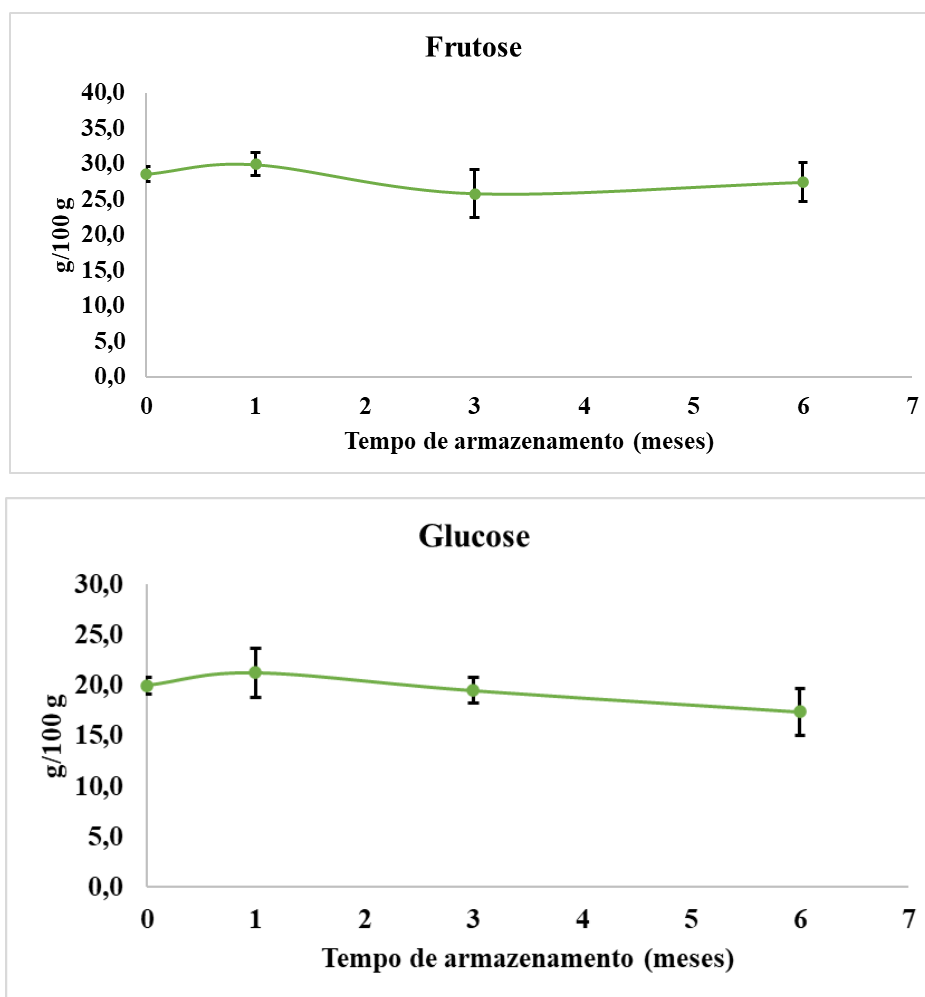
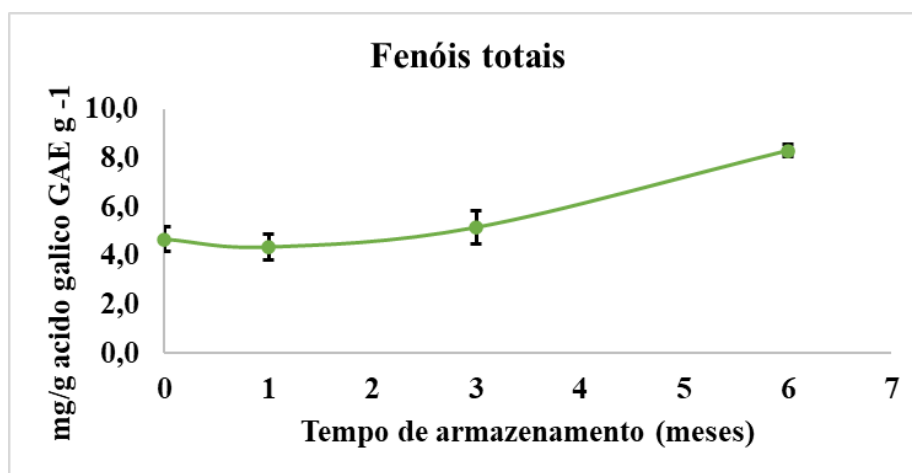


Figura 29: Avaliação do teor de hidratos de carbono, da frutose e glucose na mistura ao longo.

4.3.6. Compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante

Relativamente aos compostos fenólicos totais, flavonóides e respetiva atividade antioxidante, os resultados encontram-se apresentados na **Figura 30**. Para os compostos fenólicos totais, verificou-se uma tendência, estatisticamente significativa, para o aumento do teor de compostos fenólicos ao longo do período de armazenamento: quando a mistura é preparada, registou-se um teor de compostos fenólicos totais de 4,35 mg GAE/g, e no final de 6 meses de armazenamento esse valor aumentou para 8,30 mg GAE/g. Este resultado poderá indicar que, durante o armazenamento da mistura do pão de abelha e mel, existe algum tipo de processo, como a hidrólise da ligação a outros compostos, como é o caso de monossacarídeos, que poderá facilitar a extração dos compostos fenólicos e sua posterior quantificação. Já em relação aos compostos

flavonóides, não foi registada qualquer variação estatisticamente significativa no seu teor ao longo dos 6 meses de armazenamento. Relativamente à atividade antioxidante, expressa como a % de inibição, foi possível verificar a existência de variações estatisticamente significativas, nomeadamente entre os valores para as misturas armazenadas durante 1 mês e as misturas armazenadas durante 3 e 6 meses: 55,1%, 41,0% e 39,2%, respetivamente. De facto, a **Figura 30** mostra que não existe uma redução na atividade antioxidante durante o primeiro mês de armazenamento, mas que a partir desse momento se verifica uma redução na % de inibição, o que traduz uma perda de bioatividade, apesar do aumento registado durante o armazenamento, na quantidade de compostos fenólicos detetados. De uma forma geral, os compostos fenólicos são reportados como sendo responsáveis por uma diversidade de atividades biológicas, entre elas a atividade antioxidante. No entanto, a extensão da sua bioatividade é bastante influenciada por fatores, como a exposição à luz, temperatura, presença de outros compostos, etc.... Num estudo realizado por Smati (2021), verificou-se que a atividade antioxidante do pão de abelha armazenado à temperatura ambiente se manteve inalterada durante um período de armazenamento de 6 meses. Desta forma, o resultado obtido no presente trabalho, deixa em aberto a possibilidade de que a presença do mel poderá, de alguma forma, ter influência na redução da atividade antioxidante que foi verificada.



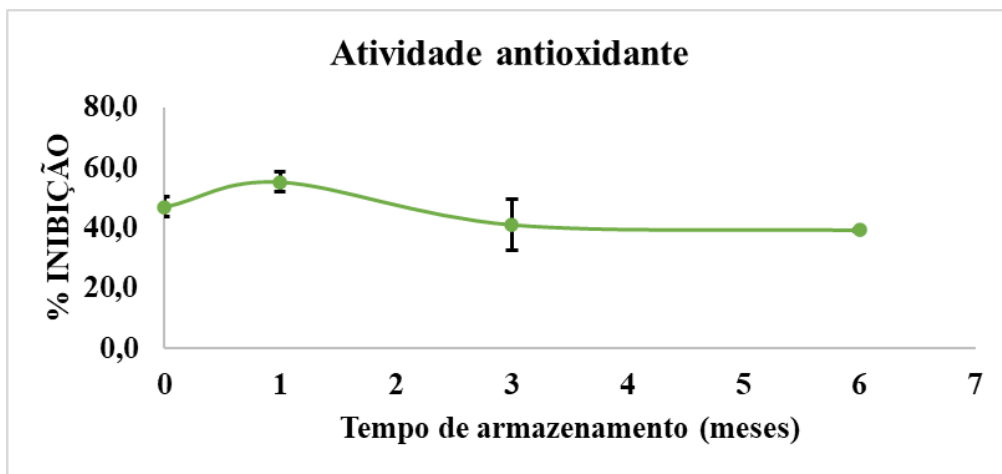
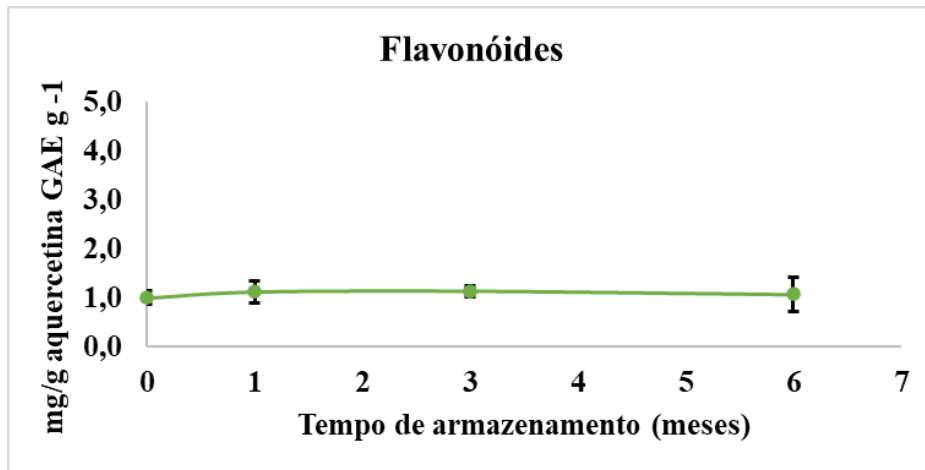


Figura 30: Teor de fenóis totais, flavonóides e atividade antioxidante na mistura ao longo tempo de armazenamento.

4.4. Estabilidade microbiológica

Os resultados obtidos para os parâmetros microbiológicos da mistura ao longo do tempo estão apresentados na **Figura 31**. Os valores para os mesófilos aeróbios variaram entre 2,33 e 3,12 \log_{10} UFC/g ao longo da conservação, não apresentando diferenças significativas durante o período de conservação.

Os bolores na mistura foram detetados em níveis baixos durante o armazenamento, entre 2,52 e 2,56 \log_{10} UFC/g, mantendo-se estáveis ao longo dos 6 meses de armazenamento. As leveduras apresentaram valores que variaram entre não detetado e 2,61 \log_{10} UFC/g (**Figura 31**). Apesar das variações observadas, as diferenças ao longo do tempo não foram significativas. Mais uma vez, os baixos valores registados encontram-se muito próximos dos limites de deteção, o que pode levar a maiores desvios analíticos.

Na **Figura 31** podemos ver que os esporos de clostrídios sulfito-redutores apresentaram uma diminuição no decorrer do tempo de armazenamento, de 0,82 \log_{10} UFC/g em T0 para indetetável após 1 a 6 meses de armazenamento.

Os coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus* e as bactérias do ácido láctico não foram detetados na mistura ao longo do tempo de armazenamento.

De acordo com os resultados microbiológicos apresentados acima, a mistura demonstrou ser estável durante o tempo de armazenamento, porque à medida que aumenta o tempo de armazenamento, os microrganismos mantêm-se estáveis ao longo do tempo.

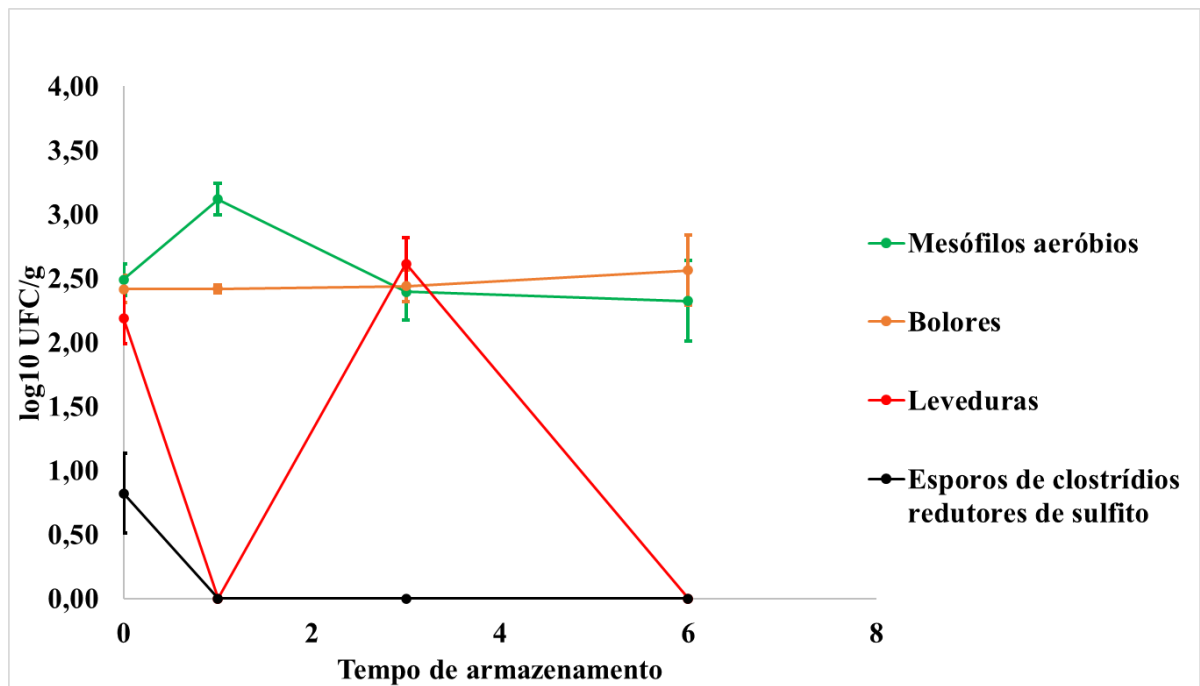


Figura 31: Avaliação microbiológica da mistura ao longo tempo de armazenamento.



Capítulo 6

5. Conclusões

5. Conclusões

O presente estudo demonstrou que relativamente a avaliação da estabilidade, a atividade da água, o pH, a cor, a atividade antioxidante (DPPH) e os compostos fenólicos foram influenciados pelo tempo, mas a influência não foi significativa de forma a interferir na composição da mistura. Porém, o tempo não apresentou um efeito significativo sobre o conteúdo de proteínas, gorduras, cinzas e hidratos de carbono, sobre o teor de humidade, flavonoides, acidez livre e açúcares.

Podemos concluir que a mistura de pão de abelha e mel ao ponto de vista nutricional apresentou ser interessante e equilibrada, devido as suas características apresentadas ao longo do período de armazenamento de seis meses, assim preservando a qualidade nutricional, a estabilidade microbiológica e características da mistura. Uma possível explicação para a redução da atividade antioxidante, que se verificou durante o armazenamento, poderá estar relacionada com a influenciada de muitos fatores, como a exposição à luz, temperatura, presença de outros compostos, mesmo com uma quantidade de compostos fenólicos que aumenta longo do tempo, no entanto para confirmar está hipótese será necessário a realização de estudos posteriores. A mistura de pão de abelha e mel evidenciou uma elevada estabilidade microbiológica durante o período de armazenamento avaliado.

Da avaliação efetuada no presente estudo, pode-se concluir que a mistura de mel e pão de abelha na proporção de 70:30 parece ser uma boa opção de utilização e valorização do pão de abelha pelos produtores, permitindo assim aumentar o rendimento obtido na prática apícola.

Além das suas características físico-químicas e nutricionais, e da elevada estabilidade, é um alimento de fácil consumo e não requer nenhuma preparação por parte do consumidor, sendo uma alternativa ideal para ser usado no pequeno-almoço ou lanches.

Em caso de comercialização desse produto, seria bom ponderar a sua comercialização em uma embalagem que o protegesse, por exemplo da ação da luz e de outros fatores que poderiam o prejudicar.

Em um futuro estudo, aconselhava a investigar o que leva a perda da atividade antioxidante e o aumento dos compostos fenólicos, estudar os diferentes tipos de

embalagens para mistura, para verificar se está relacionado com isso, vendo qual é a embalagem mais adequada se é um vidro mais opaco ou um mais transparente. E também o efeito da luz sobre o produto.

Referências Bibliográficas

- Akhmetova, R., Sibgatullin, J., Garmonov, S., & Akhmetova, L. (2012). Technology for Extraction of Bee-bread from the Honeycomb. *Procedia Engineering*, 42, 1822–1825. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.577>
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 15–23. <https://doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6>
- AOSAN, C. (2015). Pain d'abeilles naturel. *Abeilles & Cie*, 25-29. https://www.cari.be/medias/abcie_articles/166_apithe.pdf
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2005). *Clostridium botulinum*. 5.
- Aylanc, V., Ertosun, S., Russo-Almeida, P., Falcão, S. I., & Vilas-Boas, M. (2022). Performance of green and conventional techniques for the optimal extraction of bioactive compounds in bee pollen. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(6), 3490–3502. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15672>
- Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaid, D., El Ghouizi, A., Es-Safi, I., Mechchate, H., & Lyoussi, B. (2022). Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics*, 11(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020203>
- Barta, D. G., Cornea-Cipcigan, M., Margaoan, R., & Vodnar, D. C. (2022). Biotechnological Processes Simulating the Natural Fermentation Process of Bee Bread and Therapeutic Properties-An Overview. *Frontiers in Nutrition*, 9, 871896. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.871896>
- Bertoldi, F. C., Reis, V. D. A. dos, Gonzaga, L. V., & Congro, C. R. (2007). Caracterização físico-química e sensorial de amostras de mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) produzidas no pantanal. *Evidência*, 7(1), Artigo 1.
- Bogdanov, S. (2002). Harmonised methods of the International Honey Commission. *International Honey Commission (IHC)*, 1–62.

- Čadež, N., Fülöp, L., Dlačny, D., & Péter, G. (2015). *Zygosaccharomyces favi* sp. Nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(3), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0359-1>
- Caveiro, E. (2017). *Caracterização de méis comerciais rotulados com a designação de mel de urze* [Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/15037>
- de Arruda, V. A. S., Viera dos Santos, A., Figueiredo Sampaio, D., da Silva Araújo, E., de Castro Peixoto, A. L., Estevinho, M. L. F., & Bicudo de Almeida-Muradian, L. (2017). Microbiological quality and physicochemical characterization of Brazilian bee pollen. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 231–238. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1307715>
- Delsin, C. (2019). *Mel: Caracterização de processos e desenvolvimento de uma nova formulação de Melosa* [Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança]. <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/28442>
- Dimov, S. G., Zagorchev, L., Iliev, M., Dekova, T., Ilieva, R., Kitanova, M., Georgieva-Miteva, D., Dimitrov, M., & Peykov, S. (2021). A Snapshot Picture of the Fungal Composition of Bee Bread in Four Locations in Bulgaria, Differing in Anthropogenic Influence. *Journal of Fungi*, 7(10), Artigo 10. <https://doi.org/10.3390/jof7100845>
- Directiva 2001/110/CE do Conselho, de 20 de Dezembro de 2001, relativa ao mel, CONSIL, 010 OJ L (2001). <http://data.europa.eu/eli/dir/2001/110/oj/por>
- Disayathanoowat, T., Li, H., Supapimon, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Chantawannakul, P., & Guo, J. (2020). Different Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Hive-Stored Bee Bread and Their Possible Roles: A Case Study from Two Commercial Honey Bees in China. *Microorganisms*, 8(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020264>
- Dorner, M. B. (2022). Why foodborne botulism cannot be caused by honey. *Anaerobe*, 77, 102631. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102631>
- Grabowski, N. T., & Klein, G. (2017). Microbiology and foodborne pathogens in honey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1852–1862. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1029041>

- Helrich, K. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (15th ed., 1990). The Association.
- Iliá, G., Simulescu, V., Merghes, P., & Varan, N. (2021). The health benefits of honey as an energy source with antioxidant, antibacterial and antiseptic effects. *Science & Sports*, 36(4), 272.e1-272.e10. <https://doi.org/10.1016/j.scispo.2020.10.005>
- INSA. (2019). *Interpretação dos resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de produção e distribuição alimentar: Valores-guia*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>
- ISO 4833:2003. (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of microorganisms Colony-count technique at 30 degrees C*. Reino Unido. ISO 9 p. <https://www.iso.org/standard/34524.html>
- ISO 15213:2003. (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions*. Reino Unido. ISO 6 p. <https://www.iso.org/standard/26852.html>
- ISO 15214:1998. (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria—Colony-count technique at 30 degrees C*. Reino Unido. ISO 7 p. <https://www.iso.org/standard/26853.html>
- ISO 21527-2:2008. (2008). *Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds*. Reino Unido. ISO 9 p. <https://www.iso.org/standard/38276.html>
- ISO 24382:2023. (2023). *Bee pollen Specifications*. Reino Unido. ISO 33 p. <https://www.iso.org/standard/78544.html>
- Kačániová, M., Kňazovická, V., Felšöciová, S., & Rovná, K. (2012). Microscopic fungi recovered from honey and their toxinogenity. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(11), 1659–1664. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.687242>
- Khalifa, S. A. M., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N. E., Farag, M. A., Saeed, A., Xiao, J., Zou, X., Khatib, A., Göransson, U., & El-Seedi, H. R. (2020). Recent

- insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 300–316. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.021>
- Kiš, M., Furneg, S., Tkalec, V. j., Zadavec, M., BeniĆ, M., Sokolović, J., & Majnarić, D. (2019). Identification of moulds from Croatian honey. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(6), 571–576. <https://doi.org/10.3920/QAS2019.1546>
- Lopes, M. (2014). *Qualidade dos produtos apícolas da Guiné Bissau: Mel e própolis* [MasterThesis]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/11427>
- Lopes, S. (2013). *Estudo do efeito da temperatura na qualidade do mel* [Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/9284>
- López, A. C., & Alippi, A. M. (2009). Diversity of *Bacillus megaterium* isolates cultured from honeys. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.001>
- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59(4), 139–157. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1978.11097714>
- Maia, B. B. F. (2022). *Implementação dos métodos de detecção de Cronobacter spp. E enumeração de fungos em géneros alimentícios no laboratório MicroChem* [MasterThesis]. <https://run.unl.pt/handle/10362/153892>
- Maikanov, B., Mustafina, R., Auteleyeva, L., Wiśniewski, J., Anusz, K., Grenda, T., Kwiatek, K., Goldsztejn, M., & Grabczak, M. (2019). Clostridium botulinum and Clostridium perfringens Occurrence in Kazakh Honey Samples. *Toxins*, 11(8), 472. <https://doi.org/10.3390/toxins11080472>
- Man, D. (2015). *Shelf Life: Vol. Second edition*. Wiley-Blackwell. https://eds.s.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=7&sid=51679f0f-d70c-429d-ab1e-4df7520bd87d%40redis&bdata=JkF1dGhUeXBIPWlwLHNNoaWImbGFuZz1wdC1wdCZzaXRIPWVkey1saXZlJnNjb3BIPXNpdGU%3d#AN=993297&db=eds_ebk
- Mărgăoan, R., Mărghițaș, L. Al., Dezmirean, D. S., Dulf, F. V., Bunea, A., Socaci, S. A., & Bobiș, O. (2014). Predominant and Secondary Pollen Botanical Origins Influence the Carotenoid and Fatty Acid Profile in Fresh Honeybee-Collected

- Pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(27), 6306–6316.
<https://doi.org/10.1021/jf5020318>
- Mărgăoan, R., Stranț, M., Varadi, A., Topal, E., Yücel, B., Mihaiela Cornea-Cipcigan, Maria G. Campos, & Dan C. Vodnar. (2019). Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits. *Antioxidants*, 8(12), 568–568.
<https://doi.org/10.3390/antiox8120568>
- Martins, V. S. P. (2018). *Desenvolvimento e otimização de uma barra de cereais sem glúten, sem lactose e sem açúcar adicionado* [MasterThesis].
<http://repositorio.ipv.pt/handle/20.500.11960/2077>
- Melo, R. J. P. (2016). *Estudo de méis monoflorais incluindo casos particulares: Méis de alfarroba, medronheiro, poejo e tomilho* [MasterThesis].
<https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/13865>
- Migdał, W., Owczarczyk, H. B., Kędzia, B., Hołderna-Kędzia, E., & Madajczyk, D. (2000). Microbiological decontamination of natural honey by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 57(3), 285–288.
[https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(99\)00470-3](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(99)00470-3)
- Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N.-K., & Zawawi, N. (2020). Botanical Origin and Nutritional Values of Bee Bread of Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) from Malaysia. *Journal of Food Quality*, 2020, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2020/2845757>
- Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N.-K., & Zawawi, N. (2021a). Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *Journal of Apicultural Research*, 60(1), 172–187.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801152>
- Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N.-K., & Zawawi, N. (2021b). Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): Chemical and Microbiology Properties and Health Benefits. *Molecules*, 26(4), 957.
- Mouffok, K. (2021). *Quality evaluation and biological properties of Algerian commercial honeys labeled as Rosemary, Tamarisk, Thistle and multiflora* [MasterThesis]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/24074>

- Nyau, V., Mwanza, E., & Moonga, B. (2016). *PHYSICO-CHEMICAL QUALITIES OF HONEY HARVESTED FROM DIFFERENT BEEHIVE TYPES IN ZAMBIA*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4564.8244>
- Ohe, W. V. D., Oddo, L. P., Piana, M. L., Morlot, M., & Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S18–S25. <https://doi.org/10.1051/apido:2004050>
- Possebon, G. (2022). *Análise voltamétrica cíclica: Uma ferramenta para a análise qualitativa do mel* [MasterThesis]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/26125>
- Ribeiro, M. I., Fernandes, A., Matos, A., & Cabo, P. (2010). Produtos locais: O consumo de mel no distrito de Bragança. *Actas do IV Congresso de Estudos Rurais*, 216–228.
- Rodríguez-Andrade, E., Stchigel, A. M., Terrab, A., Guarro, J., & Cano-Lira, J. F. (2019). Diversity of xerotolerant and xerophilic fungi in honey. *IMA Fungus*, 10(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0021-7>
- Sakač, M. B., Jovanov, P. T., Marić, A. Z., Pezo, L. L., Kevrešan, Ž. S., Novaković, A. R., & Nedeljković, N. M. (2019). Physicochemical properties and mineral content of honey samples from Vojvodina (Republic of Serbia). *Food Chemistry*, 276, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.149>
- Sinacori, M., Francesca, N., Alfonzo, A., Cruciata, M., Sannino, C., Settanni, L., & Moschetti, G. (2014). Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. *Food Microbiology*, 38, 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.013>
- Sinpoo, C., Williams, G., & Chantawannakul, P. (2017). Dynamics of fungal communities in corbicular pollen and bee bread. *Chiang Mai Journal of Science*, 44, 1244–1256.
- Smati, N. (2022). *Bee bread preservation methods: Physical, chemical and microbial stability throughout storage* [Dissertação de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Bragança]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/25277>

- Tomás, A. (2013). *Pão de abelha do Nordeste Transmontano: Caracterização química, nutricional e actividade antioxidante* [Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/10297>
- Tomás, A., Falcão, S. I., Russo-Almeida, P., & Vilas-Boas, M. (2017). Potentialities of beebread as a food supplement and source of nutraceuticals: Botanical origin, nutritional composition and antioxidant activity. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 219–230. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1294526>
- Vargas, T. (2006). *Avaliação de qualidade do mel produzido na região dos campos gerais do Paraná* [Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa]. <https://www.livrosgratis.com.br/ler-livro-online-91155/avaliacao-de-qualidade-do-mel-produzido-na-regiao-dos-campos-gerais-do-parana>
- Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Patch, H. M. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.008>
- Vergeron, P. (1964). INTERPRÉTATION STATISTIQUE DES RÉSULTATS EN MATIÈRE D'ANALYSE POLLINIQUE DES MIELS. *Annales de l'Abeille*, 7(4), 349–364. <https://doi.org/10.1051/apido:19640407>
- Vilares, C. S. A. (2020). *Desenvolvimento de barras energéticas com pólen apícola e pão de abelha* [Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/23068>

Anexo

Análise polínica do mel

	FAMÍLIA /Tipo polínico	Pólen Total		Pólen nectaríferas*			FAMÍLIA /Tipo polínico	Pólen Total		Pólen nectaríferas*		
		Nº	%	Nº	%			Nº	%	Nº	%	
APIACEAE	APIACEAE											
APIACEAE	Tipo <i>Oenantho crocata</i>	5	0,37	5	0,49							
ASTERACEAE	ASTERACEAE											
ASTERACEAE	<i>Galactites tomentosa</i>	13	0,96	13	1,26							
ASTERACEAE	Tipo <i>Calendula arvensis</i>	1	0,07	1	0,10							
ASTERACEAE	Tipo <i>Crepis capillaris</i>	1	0,07	1	0,10							
BORAGINACEAE	BORAGINACEAE											
BORAGINACEAE	<i>Echium</i> sp.	54	3,98	54	5,25		BORAGINACEAE	<i>Echium</i> sp.	54	3,98	54	5,25
BORAGINACEAE	<i>Anchusa</i> sp.	2	0,15	2	0,19							
BORAGINACEAE	<i>Omphalodes</i> sp.	34	2,51	34	3,30							
BRASSICACEAE	BRASSICACEAE											
BRASSICACEAE	Tipo <i>Brassica napus</i>	2	0,15	2	0,19							
CAMPANULACEAE	CAMPANULACEAE											
CAMPANULACEAE	<i>Jasione montana</i>	5	0,37	5	0,49							
CISTACEAE	CISTACEAE											
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	130	9,58				CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	130	9,58		
CISTACEAE	<i>Cistus</i> sp.	102	7,52				CISTACEAE	<i>Cistus</i> sp.	102	7,52		
CISTACEAE	<i>Helianthum</i>	1	0,07									
CONVOLVULACEAE	CONVOLVULACEAE	1	0,07	1	0,10							
CYTINACEAE	CYTINACEAE											
CYTINACEAE	<i>Cytisus</i> sp.	37	2,73	37	3,60							
ERICACEAE	<i>Erica</i> sp.	1	0,07	1	0,10							
FABACEAE	FABACEAE											
FABACEAE	Tipo <i>Genista hirsuta</i>	393	28,96	393	38,19		FABACEAE	Tipo <i>Genista hirsuta</i>	393	28,96	393	38,19
FABACEAE	<i>Trifolium</i> sp.	2	0,15	2	0,19							
FAGACEAE	FAGACEAE											
FAGACEAE	<i>Quercus</i> sp.	67	4,94				FAGACEAE	<i>Quercus</i> sp.	67	4,94		
LAMIACEAE	LAMIACEAE											
LAMIACEAE	<i>Lavandula</i> sp.	347	25,57	347	33,72		LAMIACEAE	<i>Lavandula</i> sp.	347	25,57	347	33,72
LAMIACEAE	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2	0,15	2	0,19							
MYRTACEAE	MYRTACEAE											
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i> sp.	3	0,22	3	0,29							
MYRTACEAE	<i>Myrtus communis</i>	16	1,18	16	1,55							
OLEACEAE	OLEACEAE											
OLEACEAE	<i>Olea europaea</i>	25	1,84									
OXALIDACEAE	OXALIDACEAE											
OXALIDACEAE	<i>Oxalis pes-caprae</i>	1	0,07	1	0,10							
PINACEAE	PINACEAE	1	0,07									
PLANTAGINACEAE	PLANTAGINACEAE											
PLANTAGINACEAE	<i>Anarrhinum bellidifolium</i>	36	2,65	36	3,50							
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i> sp.	1	0,07									
POLYGONACEAE	POLYGONACEAE											
POLYGONACEAE	Tipo <i>Rumex acetosa</i>	1	0,07									
PUNICACEAE	PUNICACEAE											
PUNICACEAE	<i>Punica granatum</i>	18	1,33	18	1,75							
RESEDACEAE	RESEDACEAE											
RESEDACEAE	<i>Sesamoides</i> sp. ou <i>Reseda</i> sp.	1	0,07	1	0,10							
RUTACEAE	RUTACEAE											
RUTACEAE	<i>Citrus</i> sp.	2	0,15	2	0,19							
SALICACEAE	SALICACEAE											
SALICACEAE	<i>Salix</i> sp.	30	2,21	30	2,92							
	Outros	22	1,62	22	2,14							
	TOTAL	1357	100	1029	100							

Análise polínica do pão de abelha

	FAMÍLIA /Tipo polínico	Pólen Total		Pólen nectaríferas*			FAMÍLIA /Tipo polínico	Pólen Total		
		Nº	%	Nº	%			Nº	%	
ARALIDACEAE	ARALIDACEAE									
ARALIDACEAE	<i>Hedera helix</i>	1	0,10		#DIV/0!		BORAGINACEAE	<i>Echium sp.</i>	36	3,48
ASTERACEAE	ASTERACEAE						CAMPANULACEAE	<i>Jasione montana</i>	69	6,67
ASTERACEAE	Tipo <i>Crepis capillaris</i>	6	0,58		#DIV/0!		FABACEAE	<i>Trifolium sp.</i>	38	3,67
ASTERACEAE	<i>Centaurea sp.</i>	10	0,97		#DIV/0!		FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	460	44,44
BORAGINACEAE	BORAGINACEAE						RESEDACEAE	<i>Sesamoides sp. ou Reseda</i>	56	5,41
BORAGINACEAE	<i>Echium sp.</i>	36	3,48		#DIV/0!		ROSACEAE	<i>Rubus sp.</i>	144	13,91
BRASSICACEAE	BRASSICACEAE									
BRASSICACEAE	Tipo <i>Brassica negus</i>	8	0,77		#DIV/0!					
CAMPANULACEAE	CAMPANULACEAE									
CAMPANULACEAE	<i>Jasione montana</i>	69	6,67		#DIV/0!					
CARYOPHYLLACEAE	CARYOPHYLLACEAE									
CARYOPHYLLACEAE	<i>Corrigiola sp.</i>	25	2,42		#DIV/0!					
CISTACEAE	CISTACEAE									
CISTACEAE	<i>Cistus sp.</i>	7	0,68		#DIV/0!					
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	4	0,39		#DIV/0!					
CONVOLVULACEAE	CONVOLVULACEAE	1	0,10		#DIV/0!					
CRASSULACEAE	CRASSULACEAE									
CRASSULACEAE	<i>Sedum sp.</i>	15	1,45		#DIV/0!					
FABACEAE	FABACEAE									
FABACEAE	<i>Vicia sp.</i>	1	0,10		#DIV/0!					
FABACEAE	<i>Trifolium sp.</i>	38	3,67		#DIV/0!					
FABACEAE	Tipo <i>Cytisus striatus</i>	30	2,90		#DIV/0!					
FABACEAE	<i>Dorycnium</i>	1	0,10		#DIV/0!					
FAGACEAE	FAGACEAE									
FAGACEAE	<i>Quercus sp.</i>	4	0,39		#DIV/0!					
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	460	44,44		#DIV/0!					
LAMIACEAE	LAMIACEAE	21	2,03		#DIV/0!					
LAMIACEAE	<i>Thymus sp.</i>	13	1,26		#DIV/0!					
LAMIACEAE	<i>Lavandula sp.</i>	27	2,61		#DIV/0!					
LILIAEAE	LILIAEAE	1	0,10		#DIV/0!					
PLANTAGINACEAE	PLANTAGINACEAE									
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago sp.</i>	18	1,74		#DIV/0!					
POACEAE	POACEAE	4	0,39		#DIV/0!					
POACEAE	<i>Zea mays</i>	1	0,10		#DIV/0!					
RESEDACEAE	RESEDACEAE									
RESEDACEAE	<i>Sesamoides sp. ou Reseda sp.</i>	56	5,41		#DIV/0!					
ROSACEAE	ROSACEAE									
ROSACEAE	<i>Rubus sp.</i>	144	13,91		#DIV/0!					
ROSACEAE	<i>Prunus sp.</i>	3	0,29		#DIV/0!					
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i>	2	0,19		#DIV/0!					
SIMAROUBACEAE	SIMAROUBACEAE									
SIMAROUBACEAE	<i>Ailanthus altissima</i>	1	0,10		#DIV/0!					
SOLANACEAE	SOLANACEAE	4	0,39		#DIV/0!					
THYMELAEACEAE	THYMELAEACEAE									
THYMELAEACEAE	<i>Daphne genkwa</i>	1	0,10		#DIV/0!					
	Outros	23	2,22		#DIV/0!					
	TOTAL	1035	100	0	#DIV/0!					